



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO MATERNO INFANTILE E DI BIOLOGIA GENETICA

SEZIONE DI BIOLOGIA GENETICA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE CURRICULUM GENOMICA

CICLO XXI

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO:

Analisi dell'espressione del retrovirus

“Human T-cell Leukemia Virus” di tipo 2 (HTLV-2)

in linee cellulari infettate e in linfociti di pazienti

S.S.D. BIO/11

Coordinatore: Prof.ssa CARLA VOLTATTORNI

Tutor: Prof. UMBERTO BERTAZZONI

Dottoranda: Dott.ssa PAOLA RIGHI

1. INDICE

1. INDICE	1
2. RIASSUNTO	5
3. SUMMARY	9
4. INTRODUZIONE.....	13
4.1 LA SCOPERTA DEI RETROVIRUS HTLV	14
4.2 CLASSIFICAZIONE E DISTRIBUZIONE.....	15
4.3 TRASMISSIONE VIRALE.....	17
4.4 MALATTIE ASSOCIATE AD HTLV-1.....	19
4.4.1 <i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i>	20
4.4.2 <i>TSP/HAM: manifestazioni neurologiche dell'infezione da HTLV-1</i> ____	22
4.4.3 <i>Uveiti, artriti e altre malattie autoimmuni</i>	23
4.4.4 <i>Malattie infettive</i>	24
4.5 MALATTIE ASSOCIATE AD HTLV-2.....	24
4.6 MECCANISMI DI INFEZIONE DI HTLV	26
4.7 PATOGENESI E RISPOSTA DELL'OSPITE.....	28
4.8 ASPETTI TERAPEUTICI E VACCINI.....	30
4.9 COINFEZIONE HIV-1/HTLV	31
4.10 ORGANIZZAZIONE GENICA E TRASCRIZIONE.....	34
4.11 LE PROTEINE TAX-1 E TAX-2	40
4.11.1 <i>La struttura di Tax</i>	41
4.11.2 <i>Interazione di Tax con proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale</i>	43
4.11.2.1 <i>Via di segnalazione CREB/ATF</i>	44
4.11.2.2 <i>Via di segnalazione SRF</i>	45
4.11.2.3 <i>Via di segnalazione NF-κB</i>	45
4.11.3 <i>Influenza di Tax sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'instabilità genetica</i>	48
4.11.4 <i>Localizzazione e modificazioni post-traduzionali</i>	50
4.11.5 <i>Secrezione</i>	52
5. SCOPO DELLA RICERCA	54
6. MATERIALI E METODI.....	56

6.1	COLTURE CELLULARI.....	57
6.1.1	LINEE CELLULARI	57
6.1.2	PBMC.....	58
6.2	TRASFEZIONI	58
6.3	ANTICORPI.....	58
6.4	IMMUNOCITOCHIMICA E MICROSCOPIA CONFOCALE	59
6.5	NI-NTA PULLDOWN E ANALISI WESTERN BLOT	59
6.6	SAGGI DI TRANSATTIVAZIONE	60
6.7	CLONAGGI MOLECOLARI E SEQUENZIAMENTI.....	61
6.7.1	COSTRUZIONE DI VETTORI D'ESPRESSIONE	61
6.7.2	CLONAGGIO DI PORZIONI DEI TRASCRITTI DI HTLV-2.....	62
6.8	ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI	64
6.9	RETROTRASCRIZIONE DEL RNA	64
6.10	REAL TIME PCR.....	65
7.	RISULTATI	69
7.1	LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DELLA PROTEINA TAX DI HTLV E SUE MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI.....	70
7.1.1	SISTEMI PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE TAX-1 E TAX-2B	70
7.1.2	ANALISI DELLA CAPACITÀ TRANSATTIVANTE DELLE PREOTEINE TAX-1 E TAX-2	71
7.1.3	MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI DI TAX-2B.....	72
7.1.4	LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI TAX-1 E TAX-2B	72
7.2	ANALISI DEI LIVELLI D'ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DI HTLV-2 .	74
7.2.1	TIPOLOGIE DI CAMPIONI ANALIZZATI.....	74
7.2.2	ANALISI TAQMAN REAL-TIME PCR	75
7.2.3	MESSA A PUNTO DELLA METODOLOGIA DI ESTRAZIONE E RETROTRASCRIZIONE DEL RNA	75
7.2.4	MESSA A PUNTO DELLE REAZIONI DI AMPLIFICAZIONE	77
7.2.5	QUANTIFICAZIONI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DI HTLV-2	80
7.2.6	ANALISI DI COLTURE CELLULARI IN FASE ESPONENZIALE DI CRESCITA	81

7.2.7 ANALISI DELLA CINETICA D'ESPRESSIONE DELLA LINEA CELLULARE BJAB-Gu	84
7.2.8 ANALISI DELLA CINETICA D'ESPRESSIONE DELLA LINEA CELLULARE T C344 Mo	86
7.2.9 ANALISI DELLA CINETICA DI RIATTIVAZIONE DEL VIRUS IN PBMC	87
8. DISCUSSIONE	89
8.1 LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DELLA PROTEINA TAX DI HTLV E SUE MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI.....	90
8.2 ANALISI DEI LIVELLI D'ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DI HTLV-2 .	92
9. BIBLIOGRAFIA	96
10. ABBREVIAZIONI.....	132
11. PUBBLICAZIONI.....	135

2. RIASSUNTO

Durante lo svolgimento del dottorato sono state seguite due diverse linee di ricerca. La prima ha riguardato lo studio della proteina transattivatrice Tax del retrovirus umano HTLV (Human T Cell Leukemia Virus) ed, in particolare, il confronto fra le proteine Tax-1 e Tax-2B, rispettivamente di HTLV-1 e HTLV-2B, e l'analisi delle modificazioni post-traduzionali di Tax-2B. La seconda linea di ricerca ha riguardato lo studio dei livelli di espressione dei diversi trascritti di HTLV-2.

Per il primo progetto di ricerca, il lavoro è stato focalizzato sulla proteina Tax in quanto ritenuta responsabile della differente patogenicità dei due virus (Lewis et al., 2002). Allo scopo di evidenziare possibili differenze in grado di spiegare questa diversa patogenicità, sono state confrontate le proteine Tax-1 e Tax-2B, che presentano un'omologia di sequenza aminoacidica del 85% (Feuer e Green, 2005). Si è rivelata particolarmente importante la messa a punto di un sistema di rilevazione delle due proteine, basata sull'inserzione di un tag interno a ciascuna proteina (Flag-6His, abbreviato come "F") che non ne interferisce con le proprietà transattivanti e che permetta di identificare le due proteine con un solo anticorpo, il che non risultava ancora possibile. Questo sistema ha permesso di osservare che Tax-2B si trova localizzata sia nel citoplasma che in "nuclear bodies" e che è in grado di indurre la traslocazione della subunità RelA di NF- κ B e il suo reclutamento all'interno di queste strutture, come è stato già osservato per Tax-1 (Lamsoul et al., 2005). Questi risultati innovativi sono stati recentemente pubblicati (Turci et al., 2009)

E' stato, inoltre, possibile confrontare la localizzazione intracellulare delle proteine Tax-1 e Tax-2B, argomento ancora largamente dibattuto in letteratura (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004a; Semmes et al., 1996; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2006), mettendo in luce il fatto che Tax-2B si ritrova localizzata sia nel citoplasma che nei "nuclear bodies" nella maggior parte delle cellule.

Il sistema di rilevazione messo a punto in questo progetto ha permesso, inoltre, di confrontare le capacità transattivanti di Tax-1 e Tax-2B mostrando che presentano una efficienza simile, anche se non identica, nell'attivare l'espressione genica attraverso la via NF- κ B.

In questo studio, inoltre, sono state osservate per la prima volta le forme ubiquitinate e sumoilate di Tax-2B, già evidenziate per Tax-1 (Lamsoul et al., 2005).

La seconda linea di ricerca ha riguardato la messa a punto di un sistema efficace e riproducibile per la rilevazione e la quantificazione dei diversi trascritti del virus HTLV-2. Il genoma di questo virus, costituito da due copie di RNA a singolo filamento

di circa 9 Kb, necessita di essere integrato (come DNA provirale) all'interno del genoma della cellula ospite. Le proteine strutturali ed accessorie di questo virus vengono prodotte a partire sia dal mRNA "full length" che da mRNA ottenuti in seguito a singolo o doppio splicing. L'ottenimento di un modello preciso del profilo di espressione virale può fornire informazioni importanti nella comprensione del ruolo funzionale di specifici geni virali nel processo di infezione e di trasformazione cellulare (Feuer e Green, 2005; Kashanchi e Brady, 2005; Nicot et al., 2005; Li et al., 2009). Lo studio è stato, quindi, volto ad evidenziare eventuali differenze di espressione a diversi stadi di infezione del virus e in diversi sistemi cellulari.

Per la valutazione dell'espressione virale l'analisi è stata messa a punto l'analisi TaqMan Real-Time RT-PCR in cellule infettate da HTLV-2, che prevede l'amplificazione del cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA totale estratto.

Nella prima parte dello studio sono state analizzate tre diverse linee cellulari: le linee T Mo-T e C344 Mo (infettate da HTLV-2A) e la linea B BJAB-Gu (infettata da HTLV-2B). L'analisi è stata inizialmente condotta su cellule in fase esponenziale di crescita ed ha evidenziato livelli diversi di espressione dei trascritti fra le linee T e la linea B, in quanto sono stati ottenuti profili di espressione simili per le due linee cellulari T mentre la linea cellulare B ha mostrato un pattern diverso.

Successivamente, è stata analizzata la cinetica di espressione del trascrittoma virale nelle linee BJAB-Gu e C344 Mo. Per sincronizzare l'espressione virale le cellule sono state piastrate ad un decimo della loro concentrazione ottimale, diluendo le cellule in crescita esponenziale con il mezzo di coltura. Campioni di cellule sono stati prelevati ed analizzati a diversi tempi dall'inizio della coltura prendendo in considerazione il tempo di divisione cellulare delle due linee (24 ore per la linea BJAB-Gu e 48 ore per la linea C344 Mo). Questa analisi ha mostrato, per la linea BJAB-Gu, una cinetica di espressione precoce con un ciclo di circa 48 ore per alcuni trascritti (tax/rex e p28,p22/p20-1) ed una più tardiva con un ciclo di circa 96 ore per altri trascritti (gag/pol, env e p28,p22/p20-2). Per la linea C344 Mo, tutti i trascritti analizzati hanno mostrato un picco di espressione nelle prime 24 ore dall'inizio della messa in coltura, seguito da una fase discendente. Alcuni trascritti (tax/rex e p10/p11) hanno mostrato un andamento decrescente fino a 48 ore a cui ha fatto seguito un picco di espressione a 96 ore. Per altri trascritti (gag/pol e p28,p22/p20rex-2) è stato osservato un andamento decrescente fino a 96 ore, un successivo incremento di espressione con un picco a 144 ore ed un ulteriore profilo decrescente. Questa linea cellulare ha mostrato, quindi, un

progressivo silenziamento dell'espressione genica dopo 144 ore dalla messa in coltura iniziale delle cellule.

Successivamente, è stato condotto un esperimento utilizzando PBMC di un paziente italiano infettato con il sottotipo 2B allo scopo di analizzare la cinetica di riattivazione del virus. I PBMC criopreservati sono stati messi in coltura ed analizzati a 4, 14 e 20 ore. E' stato osservato un andamento precoce e bifasico per il trascritto tax/rex ed un aumento graduale e tardivo dei trascritti gag/pol e delle proteine accessorie p28,p22/p20-1 e -2. Il trascritto env è stato analizzato, ma non è stato possibile rilevarlo. Questi risultati sono riconducibili al fatto che il trascritto tax/rex è necessario all'inizio del ciclo di infezione per transattivare e regolare la trascrizione virale e cellulare, mentre gli altri trascritti sono necessari successivamente in quanto codificano per proteine strutturali ed accessorie.

In conclusione, in questo lavoro si è dimostrato che: le proteine Tax-1 e Tax-2B hanno presentano una efficienza simile, ma non identica, nell'attivare l'espressione genica attraverso la via NF- κ B; la proteina Tax-2B è localizzata sia nel citoplasma che nei "nuclear bodies" nella maggior parte delle cellule; la proteina Tax-2B si ritrova in forma ubiquitinata e sumoilata.

Sono stati inoltre rilevati e quantificati i diversi trascritti di HTLV-2 ottenendo profili di espressione simili per le linee cellulari T e un pattern diverso per la linea cellulare B. La cinetica di espressione virale ha mostrato un profilo ciclico bifasico nella linea B, un andamento progressivamente decrescente nella linea T e, nei PBMC di paziente infettato, un'espressione precoce per tax/rex seguita da un aumento graduale e tardivo degli altri trascritti. Questi risultati stanno ad indicare che il ciclo infettivo comporta una trascrizione più precoce del trascritto per le proteine regolatorie TaxRex a cui fa seguito quella delle proteine strutturali e accessorie.

3. SUMMARY

The research activity of this doctoral thesis was focused on two different projects. The first one concerned the study of the transactivating proteins Tax of the human retrovirus HTLV (Human T Cell Leukemia Virus), and more in detail by comparing Tax-1 and Tax-2B proteins, of HTLV-1 and HTLV-2B respectively, and analysing post-translational modifications of Tax-2B. The second project was focused on the analysis of the expression levels of the different transcripts of HTLV-2.

The first research project was centred on the study of Tax proteins, given their responsibility for. To highlight possible functional differences between Tax-1 and Tax-2B, which are considered responsible for the different pathogenicity of the two viruses (Lewis et al., 2002; Feuer e Green, 2005), a careful comparison was undertaken. To this end, a new detection system for the two proteins, based on the insertion of an internal tag (Flag-6His, named “F”), and preserving the transcriptional activities of both proteins, was developed. This system allowed to demonstrate that Tax-2B is also localized in “nuclear bodies” and that it is able to induce the translocation of the RelA subunit of NF- κ B and its recruitment in these structures, as previously observed for Tax-1 (Lamsoul et al., 2005). These innovative results have been recently published (Turci et al., 2009).

The intracellular localization of Tax-1 and Tax-2B, which is still a matter of debate (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004a; Semmes et al., 1996; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2006), was also compared. The results showed that Tax-2B is more frequently present in the cytoplasm and in “nuclear bodies” as compared to Tax-1.

The tagging system devised in this study for Tax-1 and Tax-2B allowed also to compare the transactivating abilities of the two proteins, showing that Tax-1 and Tax-2B share similar, though not identical, capacities to activate gene expression via the NF- κ B pathway.

In this work, the first time demonstration that Tax-2B is modified by ubiquitination and sumoylation, was also obtained, as has been previously observed for Tax-1 (Lamsoul et al., 2005).

The second research line concerned the development of an effective and reproducible system for the detection and quantification of the seven different transcripts of HTLV-2. The genome of this retrovirus is made by two copies of single strand RNA of about 9 Kb that are integrated, as proviral DNA, into the host genome. Several structural and accessory proteins from the full length or the singly or doubly spliced mRNA are produced. Obtaining a precise profile of viral gene expression is

considered very useful for understanding the functional role of specific viral genes in the process of viral infection and cellular transformation (Feuer e Green, 2005; Kashanchi e Brady, 2005; Nicot et al., 2005; Li et al., 2009). Therefore, the study was addressed to highlight possible expression differences at different stages of viral infection and in different cellular systems.

A TaqMan Real-Time RT-PCR analysis system based on the amplification of cDNA retrotranscribed from total mRNA of HTLV-2 infected cells, was developed. In the first part of the study, three different cell lines were analyzed, namely two T-cell lines, Mo-T e C344 Mo, infected with HTLV-2A and a B-cell line, BJAB-Gu infected with HTLV-2B. The analysis on these cells was performed by sampling them at exponential phase of growth. The data obtained showed notable differences between the two T-cell lines and the B-cell line, since a similar pattern of expression for the two T-cell lines was obtained, whereas the B-cell line presented a different profile.

To obtain a more clear-cut information on viral expression patterns, the kinetics of HTLV-2 transcription in BJAB-Gu and C344 Mo cell lines were analyzed. To synchronize viral expression, the cells were plated at one tenth of optimal growth concentration by ten fold dilution of cells at exponential phase with culture medium. After harvesting cells at different times of division of the two cell lines (24 hours for BJAB-Gu and 48 hours for C344 Mo), the transcripts were analyzed. For BJAB-Gu, an early pattern of expression with a cycle of about 48 hours for tax/rex and p28,p22/p20-1 transcripts followed by a second one at about 96 hours for gag/pol, env and p28,p22/p20-2, was visualized. For C344 Mo, all transcripts showed a peak of expression within the first 24 hours followed by a decrease. Some transcripts (tax/rex and p10/p11) showed a decline up to 48 hours followed by a second peak of expression at 96 hours. For gag/pol and p28,p22/p20rex-2 a decreasing pattern of expression up to 96 hours was observed, with a subsequent peak at 144 hours, followed by a second decline. In conclusion, these cell lines showed a progressive silencing of the gene expression after 144 hours from the initial plating.

The experimental work also included the kinetics analysis of expression from PBMCs of an Italian HTLV-2B infected subject. Criopreserved PBMCs were cultured, sampled at 4, 14 and 20 hours and analyzed. For tax/rex transcript, an early and biphasic pattern of expression was observed, while gag/pol and p28,p22/p20-1 and -2 showed a gradual and late profile of expression. Also the env transcript was analyzed, but was below the limit of detection. Altogether these results suggest that the tax/rex transcript

is necessary early in infection to transactivate and regulate viral and cellular expression, whereas for other transcripts, which code for structural and accessory proteins, the expression can be delayed.

In conclusion, this work has demonstrated that: (i) Tax-1 and Tax-2B shared similar, though not identical, capacity to activate gene expression via NF- κ B pathway; (ii) Tax-2B is more frequently present in the cytoplasm and in “nuclear bodies” as compared to Tax-1; (iii) Tax-2B is modified by ubiquitination and sumoylation,

It also allowed the identification and quantification of the different HTLV-2 transcripts and showed that the two T-cell lines presented similar patterns of expression, whereas it was different for the B-cell line. The B-cell lines showed a biphasic profile and a progressive decline in the T-cells. In PBMCs obtained from an HTLV-2 infected subject, an early expression of tax/rex was accompanied by a gradual increase of structural transcripts. These results indicate that the infection cycle is based on an earlier transcription of Tax/Rex regulatory proteins followed by that of structural and accessory proteins.

4. INTRODUZIONE

I retrovirus umani HTLV (Human T-cell Leukemia Virus) appartengono al genere *Deltaretrovirus*, famiglia *Oncoretroviridae* (oncovirus di tipo C), sottofamiglia degli *Orthoretrovirinae* (Koralnik, 1996; Brady, 1996).

Ne esistono 4 diversi tipi (da HTLV-1 a HTLV-4) di cui HTLV-1 e HTLV-2 sono i principali ed i più diffusi.

4.1 LA SCOPERTA DEI RETROVIRUS HTLV

Le prime ricerche sul retrovirus umano HTLV-1 si svolsero in modo indipendente in Giappone e negli Stati Uniti.

Negli Stati Uniti, Gallo e i suoi collaboratori identificarono e riportarono per la prima volta nel 1980 la presenza di un retrovirus nella linea cellulare HUT102 ottenuta da cellule di un paziente affetto da *Mycosis fungoides*, nota anche come linfoma cutaneo delle cellule T (Poiesz et al., 1980). Tale retrovirus fu denominato HTLV-1.

Contemporaneamente, in Giappone, fu scoperta la leucemia delle cellule T dell'adulto (ATLL) da parte di Takatsuki e dei suoi collaboratori che descrissero la morfologia di tali cellule, provenienti da diversi pazienti, caratterizzate da nuclei lobulati (Uchiyama et al., 1977). A partire da queste cellule, furono ottenute alcune linee cellulari stabili (MT-1, MT-2 ed MT-4) che mostravano diverse anomalie cromosomiche (Miyoshi et al., 1980). Successivamente, furono condotti degli studi volti ad identificare la presenza di un retrovirus nella linea cellulare MT-2 ottenuta dalla co-coltivazione di linfociti con cellule leucemiche provenienti da un paziente affetto da ATLL (Yoshida et al., 1982). Tale retrovirus fu denominato ATLTV (Adult T-cell Leukemia Virus).

In seguito, fu dimostrato che le sequenze geniche di HTLV ed ATLTV erano identiche e che, quindi, corrispondevano al medesimo virus (Watanabe et al., 1984).

Successivamente, in un paziente con un caso di "Hairy cell leukemia" (tricoleucemia, una leucemia linfatica cronica) fu scoperto un virus con caratteristiche simili che fu denominato HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982).

Recentemente sono stati scoperti e caratterizzati anche i tipi HTLV-3 e HTLV-4. HTLV-3 è stato isolato da pigmei del Sud del Camerun e HTLV-4 da cacciatori africani della stessa zona geografica (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005).

4.2 CLASSIFICAZIONE E DISTRIBUZIONE

Esistono 4 diversi tipi di HTLV (da HTLV-1 a HTLV-4) di cui 3 sono strettamente correlati ai retrovirus che infettano le scimmie STLV-1, 2 e 3 (Simian T-lymphotropic viruses) (Gallo, 2005) ed è quindi probabile che siano stati trasmessi da questi primati agli uomini mediante fagia, morsi e graffi. HTLV-4, invece, non sembra somigliare ad alcun retrovirus delle scimmie (Van Dooren et al., 2007). Inoltre, molti isolati di HTLV-1 mostrano la stessa distribuzione geografica a “cluster” di isolati di STLV-1 e ciò concorda con la teoria che vi sia stata una trasmissione zoonotica (Proietti et al., 2005)

Fra i diversi tipi, HTLV-1 e HTLV-2 sono i più rappresentati e mostrano una omologia di sequenza nucleotidica pari al 70% (Green et al., 1995).

Analisi filogenetiche delle sequenze delle LTR (long terminal repeat) e del gene *env* e analisi fenotipiche della proteina regolatoria Tax mostrano l'esistenza di sei diversi sottotipi per HTLV-1 (da “A” a “F”) ciascuno dei quali è endemico in specifiche regioni. HTLV-2 presenta quattro sottotipi (da “A” a “D”) (Suzuki e Gojobori, 1998; Novoa et al., 2007; Verdonck et al., 2007; Kashima et al., 2006).

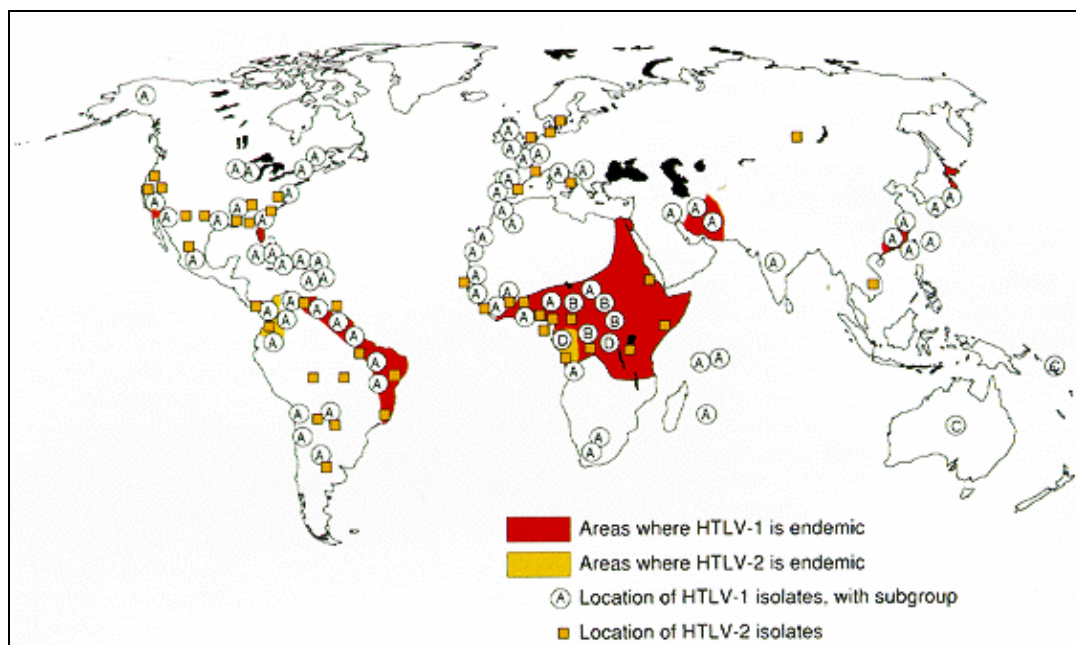


Fig 1. Distribuzione di HTLV-1 e HTLV-2 (Coffin et al., 1997).

Si stima che nel mondo circa 20 milioni di individui siano infettati da HTLV-1. Tra di essi, circa il 95% rimangono clinicamente asintomatici per tutta la durata della loro vita ed hanno, quindi, la capacità di continuare a trasmettere l'infezione (de The and Kazanji, 1996). Per quanto riguarda HTLV-2, invece, non esistono attualmente stime precise del numero di individui infettati nel mondo (Araujo and Hall., 2004).

I diversi sottotipi di HTLV-1 sono endemici in specifiche regioni (Fig. 1): il sottotipo 1A presenta una distribuzione cosmopolita, l'1B, l'1D e l'1F sono presenti in Africa Centrale, il sottotipo 1C è endemico in Melanesia e l'1E in Sud Africa (Seiki et al., 1982; Slattey et al., 1999; Proietti et al., 2005; Gessain et al., 1991; Sherman et al., 1992). Attualmente non è ancora chiaro se i diversi sottotipi possano avere differenti capacità patogeniche (Segurado et al., 2002).

Nelle popolazioni aborigene del Nord e Sud America l'infezione da HTLV-1 e HTLV-2 ha carattere endemico (Vrieling e Reesink, 2004).

L'infezione da HTLV-2 in Europa, ed in particolare in Italia, è stata dimostrata a partire dagli anni '90 (Zella et al., 1990).

In Europa e negli Stati Uniti l'infezione da HTLV colpisce prevalentemente gruppi di persone con comportamenti a rischio quali professionisti del sesso ed IDU (Intravenous Drug Users). Fra questi ultimi, la frequenza di infezione da HTLV-2 è superiore a quella da HTLV-1 in entrambi questi ambiti geografici (Lowis et al., 2002) e il sottotipo 2A è la variante più comune (Murphy et al., 1998).

HTLV-2 è stato ritrovato anche in popolazioni di pigmei dell'Africa (Goubau et al., 1992). Il sottotipo 2A è predominante nel Nord Europa (Switzer et al., 1995), mentre il 2B si ritrova quasi esclusivamente nel Sud Europa, specialmente in Italia (Salemi et al., 1995) e in Spagna (Vallejo et al., 1996) dove la percentuale di IDU coinfectati da HIV-1 è molto elevata (Zella et al., 1990; Soriano et al., 1996; Turci et al., 2006; Casoli et al., 2007). La coinfezione da HIV-1 e HTLV è stata riscontrata anche in diverse zone del Brasile (Brites et al., 1998; Laurentino et al., 2005).

La bassa variabilità genetica provirale di HTLV-1, unita alla migrazione relativamente recente di soggetti infetti, possono spiegare la natura cosmopolita del sottotipo 1A. La sua ampia diffusione geografica sembra essere avvenuta negli ultimi secoli a causa dei viaggi condotti dagli Europei alla scoperta di nuovi territori, della tratta degli schiavi o di altre migrazioni che ne hanno comportato il passaggio dall'Africa all'America (Koralnik et al., 1994; Yanagihara et al., 1995).

La situazione è diversa per HTLV-2 per la quale sono stati associati diversi sottotipi a specifiche popolazioni: per esempio HTLV-2C risulta prevalente nelle popolazioni aborigene del Brasile ed in IDU brasiliani (Eiraku et al., 1996; Proietti et al., 2005) o in persone con comportamenti a rischio, mentre HTLV-2A è predominante in persone di colore più adulte e in IDU nell'America del Nord (Murphy et al., 1998; Liu et al., 2001).

Per quanto riguarda HTLV-2, in ogni caso, vi sono pochi studi rappresentativi dell'intera popolazione: la maggior parte dei dati derivano da donatori di sangue, e quindi da soggetti a basso rischio, da gruppi di persone selezionate (donne in gravidanza, pazienti neurologici o ematologici, individui infetti, gruppi di popolazioni spesso isolate e indigene di particolari zone, IDU e professionisti del sesso) che non sono sicuramente rappresentativi dell'intera popolazione (Mueller, 1991; Ferreira et al., 1997; Manns et al., 1999).

4.3 TRASMISSIONE VIRALE

La trasmissione di HTLV può avvenire sia verticalmente che orizzontalmente: il contagio, infatti, è possibile da madre a figlio, principalmente durante l'allattamento, per contatto sessuale o per esposizione a sangue contaminato avvenuta sia per trasfusione che per condivisione di aghi e siringhe infetti (Tajima et al., 1986; Okochi e Sato, 1984; Okochi et al., 1984; Manns et al., 1999).

Nonostante il meccanismo biologico di trasmissione non sia stato ancora completamente chiarito, sembra che l'infezione avvenga attraverso la trasmissione di cellule infette e non di virioni liberi, sia che si tratti di sangue infetto, contatti sessuali o allattamento. La siero-conversione a seguito di trasfusione di sangue infetto si stima attorno al 40-60% (Okochi et al., 1984; Manns et al., 1992).

La trasmissione verticale da madre a figlio avviene in circa il 20% dei casi (Sugiyama et al., 1986) ed è stata associata ad un alto carico provirale della madre, ad un alto titolo di anticorpi e al prolungamento dell'allattamento (Kinoshita et al., 1984; Ureta-Vidal et al., 1999). In alcuni paesi, come il Giappone, l'infezione post-natale attraverso l'allattamento sembra costituire la modalità più importante nella trasmissione verticale (Hino et al., 1997). Altre forme di trasmissione da madre a figlio, come quella intrauterina o perinatale, sembrano avere minor rilevanza (Fujino e Nagata, 2000) e

potrebbero essere ostacolate dall'apoptosi delle cellule della placenta indotta da HTLV-1 (Fujino et al., 1999).

Per quanto riguarda il contagio per via sessuale, alcuni studi hanno dimostrato come risulti più efficiente la trasmissione da maschio a femmina piuttosto che il contrario (Kajiyama et al., 1986; Murphy et al., 1989a; Murphy et al., 1996; Larsen et al., 2000).

L'esposizione per via intravenosa sembra essere il modo più efficiente di trasmissione. Nel passato ciò avveniva principalmente attraverso le trasfusioni di sangue non sottoposto ad analisi per la rilevazione di HTLV (Okochi et al., 1984; Manns et al., 1992). Il rischio maggiore di contagio si ha con le trasfusioni di globuli rossi, di sangue intero e di piastrine piuttosto che di plasma (Manns et al., 1992).

Negli ultimi venti anni in molti paesi (Giappone, Stati Uniti, Canada, Brasile e altri paesi europei come Francia, Regno Unito e Spagna ma non Italia), è prevista l'analisi degli anticorpi contro HTLV-1/2 nel sangue dei donatori. Questo importante intervento di salute pubblica ha permesso di diminuire il rischio di infezione non solo da parte dei trasfusi, ma dell'intera popolazione (Osame et al., 1986a; Taylor, 1996).

Un altro importante modo di trasmissione orizzontale di HTLV-1 e HTLV-2 è costituito dallo scambio di aghi e siringhe infette da parte di IDU (Feigal et al., 1991; Khabbaz et al., 1992). HTLV-2 sembra essere più diffuso di HTLV-1 fra gli IDU dell'America del Nord e dell'Europa (Lee et al., 1989; Lee et al., 1990; Murphy et al., 1998; Liu et al., 2001), mentre fra gli IDU del Brasile e di New York è più diffuso HTLV-1 (Etzel et al., 2001; Ehrlich and Poiesz, 1988; Lee et al., 1990).

In molte aree sia endemiche che non endemiche del virus, la sieropositività è strettamente correlata all'età e al sesso: si ha un aumento con l'età ed è più elevata nelle donne (Kajiyama et al., 1986; Murphy et al., 1991; Mueller et al., 1996).

Diversi studi suggeriscono che fattori sociali ed ambientali associati a povertà possano influenzare la trasmissione di HTLV-1 sia nelle zone endemiche del virus che nel resto del mondo (Miller et al., 1986; Maloney et al., 1991).

L'incidenza delle varie vie di trasmissione sembra variare in diverse aree geografiche: in Giappone, la distribuzione geografica e il basso numero di rapporti sessuali non protetti suggeriscono che la trasmissione avvenga principalmente in maniera verticale, mentre nelle isole tropicali (Isole Caraibiche, Seycelles, Tumaco, Madagascar, Hawaii, ecc.), la distribuzione geografica del virus è più uniforme ed è più

comune tra coloro i quali hanno più partner sessuali, indicando la prevalenza della trasmissione sessuale.

4.4 MALATTIE ASSOCIATE AD HTLV-1

HTLV-1 è l'agente eziologico di una leucemia aggressiva chiamata ATLL (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma) e di una malattia neurodegenerativa chiamata TSP/HAM (Tropical Spastic Paraparesis/HTLV Associated Myelopathy).

HTLV-2 è stato originariamente isolato da un paziente affetto da *hairy cell leukemia* (leucemia a cellule capellute). E' ritenuto molto meno patogenico di HTLV-1 in quanto non è ancora stato chiaramente associato all'insorgenza di malattie ma solo a sporadici casi di forme neurodegenerative subacute (Feuer e Green, 2005; Araujo e Hall, 2004). Recentemente, è stato osservato che soggetti infettati da HTLV-2 presentano un numero più elevato di linfociti rispetto agli individui non infetti (Bartman et al., 2008). Questa osservazione potrebbe suggerire nuove vie di investigazione riguardo ai meccanismi molecolari e immunologici di questo retrovirus attualmente considerato meno patogenico di HTLV-1.

HTLV-3 e HTLV-4 non sono stati ancora associati ad alcuna patologia, probabilmente a causa del loro recente isolamento e dello scarso numero di pazienti a disposizione.

HTLV-1, come detto precedentemente, fu il primo retrovirus ad essere correlato a malattie nell'uomo. E' stato associato ad ATLL (Poiesz et al., 1980; Hinuma et al., 1981; Miyoshi et al., 1981; Yoshida et al., 1984; Takatsuki et al., 1985a; Takatsuki et al., 1985b), TSP/HAM (Cruikshank, 1956; Gessain et al., 1985; Rodgers-Johnson et al., 1985; Osame et al., 1986b), ma anche ad uveiti (Pinheiro et al., 1995; Mochizuchi et al., 1992) e dermatiti infettive (LaGrenade et al., 1990).

HTLV-1 è stato collegato anche a casi di polimiositi (Inose et al., 1992; Beilke et al., 1996), sinoviti (Sowa, 1992), tiroiditi (Kawai et al., 1992) e polmoniti bronchio-alveolari (Kimura, 1992) sebbene manchi la prova epidemiologica dell'associazione con il virus.

Le due principali malattie associate ad HTLV-1, ATLL e TSP/HAM, sono presenti in tutte le zone geografiche in cui il virus è endemico.

4.4.1 Adult T-cell Leukemia/Lymphoma

L'ATLL fu inizialmente riscontrata a Kyoto principalmente in pazienti originari del Sud-Est del Giappone (Uchiyama et al., 1977) e, anche negli anni successivi, la maggior parte dei casi descritti riguardavano pazienti provenienti da queste zone (Shimamoto e Yamaguchi, 1992; Yamaguchi e Watanabe, 2002).

Alcuni anni dopo fu descritta in immigrati provenienti dai Caraibi e residenti nel Regno Unito (Catovsky et al., 1982) e, in seguito, in altre zone endemiche come le regioni caraibiche (Gibbs et al., 1987; Hanchard, 1996), l'Africa (Fouchard et al., 1998) e il Sud America (Matutes et al., 1994; Gerard et al., 1995).

A seguito delle prime descrizioni della malattia (Takatsuki et al., 1977), l'osservazione che la distribuzione epidemiologica dell'ATLL era concentrata in gruppi di persone di determinate età in aree del sud Giappone, ha suscitato l'interesse dei ricercatori circa la possibilità che questa patologia potesse avere una origine virale. Le malattie a carico delle cellule T furono riconosciute essere le patologie linfoproliferative più comuni in alcune regioni del Giappone. A seguito della scoperta di HTLV-1 e dello sviluppo di nuovi reagenti per analisi sierologiche, fu evidente che HTLV-1 ed ATLL erano endemiche nelle medesime aree (Mueller et al., 1996; Yamaguchi e Watanabe, 2002). Solo in Giappone sono state trovate più di un milione di persone positive agli anticorpi contro HTLV-1 e più di 700 casi di ATLL vengono diagnosticati ogni anno (Yamaguchi e Watanabe, 2002).

L'associazione fra l'HTLV-1 e l'ATLL è stata provata da studi epidemiologici che hanno dimostrato la corrispondenza geografica fra HTLV-1 e ATLL e da studi sulla clonalità delle cellule leucemiche, dimostrazione dell'infezione di linfociti T *in vitro* da parte del virus. Inoltre, l'associazione è stata dimostrata anche dalla capacità oncogenica del virus in modelli animali e dalla presenza di anticorpi contro HTLV-1 nell'80-90 % dei casi di ATLL, nonché dalla possibilità di coltivare il virus a partire da cellule provenienti da pazienti affetti da ATLL e dalla presenza di provirus di HTLV-1 clonalmente integrati in cellule leucemiche (Blattner, 1990).

Il rischio di malattie associate ad HTLV-1 fra gli individui infetti differisce sostanzialmente fra le aree geografiche e in relazione ad altre caratteristiche della popolazione. Malgrado la vasta distribuzione geografica, i dati riguardanti l'incidenza dell'ATLL sono ancora scarsi e i casi riportati potrebbero essere sottostimati, a causa

del rapido decorso della malattia, della differenziazione diagnostica con patologie simili e della difficoltà di confermare la diagnosi in paesi sottosviluppati, specialmente per quanto riguarda i linfomi. L'incidenza globale dell'ATLL fra gli individui portatori di HTLV-1 è stata stimata attorno all'1-5% per entrambi i sessi nelle zone endemiche (Murphy et al., 1989b).

L'ATLL colpisce prevalentemente gli adulti dopo circa 20-40 anni dall'infezione da HTLV-1; gli individui che sono stati infettati nell'infanzia per trasmissione verticale hanno un alto rischio di sviluppare la malattia (Pawson et al., 1998). L'ATLL è associata alla trasmissione verticale principalmente attraverso l'allattamento (Wilks et al., 1996).

Sebbene l'ATLL si manifesti in Giappone tipicamente nei primi 50 anni di vita (Takatsuki et al., 1996), in Giamaica e in Brasile, i pazienti tendono a presentare la malattia nei primi 40 anni di vita il che suggerisce che esistano altri fattori che influiscono sulla sua insorgenza (Gibbs et al., 1987; Pombo-de-Oliveira et al., 1999). E' stata riportata un'alta incidenza dell'ATLL nelle persone di colore provenienti dalla Guiana Francese (Gerard et al., 1995) e in persone di colore e mulatte provenienti da alcune zone del Brasile (Pombo-de-Oliveira et al., 1999).

Molti studi hanno riscontrato la presenza di infezioni da *Strongyloides stercoralis* (SS) in casi di ATLL acuta o linfomi; è possibile che la coinfezione svolga un ruolo chiave nel processo leucemogenico in quanto si ha l'induzione della proliferazione clonale dei linfociti infettati da HTLV-1 unita ad un alto carico provirale (Gabet et al., 2000).

La patogenesi dell'ATLL e dei determinanti per la progressione della malattia sono stati solo parzialmente descritti e possono essere legati a varianti geniche del virus, all'ospite o all'ambiente (Slattery et al., 1999; Plancoulaine et al., 2000; Yashiki et al., 2001; Barmak et al., 2003). In particolare, per quanto riguarda l'ospite, è stato supposto che gli alplotipi dell'HLA (Human Leukocyte Antigen) possano aver segregato in maniera differente in diverse etnie e che questo possa influire sulla suscettibilità all'infezione da parte di HTLV-1 (Fujiyoshi et al., 1995).

Alti livelli di carico provirale possono essere associati con malattie causate da HTLV-1 anche se i fattori di rischio legati a questo parametro non sono ancora stati chiariti (Takenouchi et al., 2003; Murphy et al., 2004a).

L'ATLL è suddivisa in quattro categorie: acuta, cronica, cutanea e linfoma. La forma acuta è presente nel 55-75% dei casi di ATLL (Hanchard et al., 1990; Yamaguchi

et al., 1990) e risulta inesorabilmente e rapidamente progressiva, con complicazioni polmonari, infezioni opportunistiche e sepsi tra le principali cause di morte. Anche l'ipercalcemia non controllata può risultare letale.

Terapie chemioterapiche normalmente efficaci nel trattamento di altre malattie linfoidi, risultano inefficaci per le forme aggressive di ATLL. Pazienti affetti dalle forme cutanea e cronica presentano un decorso prolungato e, spesso, asintomatico della malattia e non esistono evidenze circa il fatto che trattamenti aggressivi possano portare dei benefici (Ishikawa, 2003).

4.4.2 TSP/HAM: manifestazioni neurologiche dell'infezione da HTLV-1

L'associazione fra HTLV-1 e TSP/HAM si deve a degli studi condotti in Giamaica e Martinica. In questi paesi furono osservati numerosi casi di paraplegia spastica in cui i pazienti erano interessati da un lento processo debilitante caratterizzato da disturbi a carico degli sfinteri e livelli variabili di disordini sensoriali (Cruikshank, 1956). Studi condotti in seguito indicarono la presenza di anticorpi contro HTLV-1 in molti dei pazienti colpiti da questa sindrome (Gessain et al., 1985; Rodgers-Johnson et al., 1985; Osame et al., 1986a) che fu in seguito denominata prima Tropical Spastic Paraparesis (TSP) e successivamente HTLV Associated Myelopathy (HAM).

Sono stati riportati occasionalmente anche casi di ATLL in pazienti affetti da TSP/HAM e viceversa (Kawai et al., 1989; Freitas et al., 1997; Goncalves et al., 1999; Kasahata et al., 2000).

HTLV-1 è stato considerato la causa della TSP/HAM a seguito di numerose evidenze: il virus è stato isolato dal fluido cerebrospinale (CSF) di pazienti affetti da TSP/HAM (Bhagavati et al., 1988); la produzione di anticorpi contro HTLV-1 nel CSF è stata osservata in alcuni pazienti (Gessain et al., 1988); la presenza del genoma virale è stata rilevata in tessuti interessati dalla patologia attraverso analisi di PCR (polymerase chain reaction) e ibridazioni *in situ* (Iannone et al., 1992; Lehky et al., 1995); lo sviluppo di TSP/HAM è stato riscontrato a seguito di trasfusioni da individui infetti a sani (Gout et al., 1990).

Questa malattia si sviluppa in circa il 4% dei pazienti infettati da HTLV-1, più frequentemente nelle donne che negli uomini (Orland et al., 2003). Generalmente la

malattia viene diagnosticata fra i 40 e i 50 anni di vita, anche se in alcuni fra i pazienti più giovani si sviluppa entro i primi 10 anni (McKhann et al., 1989; Quintas et al., 2004).

La principale via di trasmissione di HTLV-1 che porta allo sviluppo di TSP/HAM è quella sessuale, il che è convalidato dal fatto che vi sia una prevalenza nei pazienti di sesso femminile (Maloney et al., 1998).

Sono stati riportati solo pochi casi di TSP/HAM sviluppati a seguito di infezione contratta per trasfusione di sangue (Osame et al., 1986a; Gout et al., 1990).

Dal punto di vista patologico, la malattia è caratterizzata dall'infiltrazione parenchimale delle cellule mononucleate del sangue nella materia grigia e bianca del midollo spinale toracico, che porta ad una grave degenerazione e fibrosi della materia bianca (Iwasaki, 1990). Ciò sembra essere causato dalla risposta immune contro l'infezione da HTLV-1 (Sonoda, 1990; Jeffery et al., 1999).

I pazienti mostrano un carico provirale molto elevato, da 10 a 100 volte superiore di quello osservato nei portatori asintomatici (Nagai e Jacobson, 2001; Yamano et al., 2002; Nagai et al., 1998).

Al momento nessun trattamento farmacologico della TSP/HAM è risultato soddisfacente.

4.4.3 Uveiti, artriti e altre malattie autoimmuni

Oltre all'associazione fra HTLV-1 e ATLL e TSP/HAM, sono state descritte altre patologie reumatologiche in cui il genoma virale e/o proteine virali sono state riscontrate in tessuti bersaglio della malattia stessa. Queste malattie comprendono uveiti, polimiositi, polmoniti bronchioalveolari, tiroiditi ed artriti autoimmuni (Ijichi et al., 1990; Iwakura et al., 1991; Eguchi et al., 1992; Eguchi et al., 1996; Inose et al., 1992; Kawai et al., 1992; Kimura, 1992; Mochizuki et al., 1992; Sowa, 1992; Pinheiro et al., 1995; Beilke et al., 1996) anche se l'associazione epidemiologica necessita maggiori riscontri.

Nel caso delle uveiti (Mochizuki et al., 1992), sono state rilevate sequenze virali di HTLV-1 in fluidi vitrei assieme ad un numero più alto di linfociti T infettati rispetto quello riscontrato nel sangue periferico (Ono et al., 1998).

Uno studio epidemiologico condotto negli Stati Uniti ha descritto numerosi casi di artriti tra pazienti infettati da HTLV-1 (Murphy et al., 2004b). Utilizzando un modello di topo transgenico è stato possibile evidenziare un ruolo del virus nello sviluppo di artriti croniche (Yakova et al., 2005). Inoltre, alti livelli di carico provirale sono presenti nel sangue periferico e in compartimenti sinoviali di pazienti infettati da HTLV-1 e affetti da artrite reumatoide (Yakova et al., 2005).

4.4.4 Malattie infettive

Sono stati documentati numerosi casi di infezioni opportunistiche in pazienti affetti da ATLL acuta. Esse comprendono: infezioni da *Pneumocystis carinii*, aspergillosi polmonari, polmoniti da CMV (citomegalovirus), infezioni da Herpes zooster, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, e sindromi iperinfettive con *Strongyloides stercoralis* (Takatsuki et al., 1985a; Takatsuki et al., 1985b).

Alcuni pazienti infettati dal virus ma che non sviluppano ATLL sembrano avere una deficienza immunologica associata ad un aumento del rischio di complicazioni da malattie infettive, incluse strongiloidiasi (Marsh, 1996; Hayashi et al., 1997; Satoh et al., 2002).

Infezioni della pelle dovute a Stafilococchi e Streptococchi sono comuni nella sindrome dermatitica infettiva descritta in Giamaica in associazione con l'infezione da HTLV-1 nell'infanzia (La Grenade, 1996). Questa sindrome costituisce la prima manifestazione pediatrica associata ad HTLV-1 (LaGrenade et al., 1990).

4.5 MALATTIE ASSOCIATE AD HTLV-2

HTLV-2 è molto meno patogenico di HTLV-1: è stato associato solo a sporadici casi di mielopatie simili a TSP/HAM (Hjelle et al., 1992; Dooneief et al., 1996; Murphy

et al., 1997) ma non è ancora stato chiaramente legato allo sviluppo di disordini linfoproliferativi.

Il ruolo di HTLV-2 in malattie neurologiche non è ancora stato compreso, sebbene si stia consolidando la nozione che l'infezione possa essere associata a questo tipo di patologie (Araujo et al., 2002a; Berger et al., 1991; Hjelle et al., 1992; Harrington et al., 1993; Orland et al., 2003).

Attualmente, sono stati descritti pochi casi di sindromi neurologiche potenzialmente associabili ad HTLV-2 (Araujo and Hall, 2004). In molte delle descrizioni riportate in questo studio mancano sufficienti informazioni neurologiche per permettere una sicura diagnosi e/o sono limitate da elementi fuorvianti. Inoltre, la descrizione del medesimo paziente in più indagini rende difficile la stima della reale frequenza di ognuna delle sindromi.

Un'altra limitazione nella definizione del ruolo di HTLV-2 in questo tipo di disordini è dovuta al fatto che spesso gli individui analizzati presentano la coinfezione con HIV-1 e quindi è difficile stabilire a quale dei due virus siano dovute le patologie riscontrate.

Inoltre, molti dei pazienti oggetto di studio fanno parte di coorti di IDU ed è possibile che la tossicodipendenza possa influire a livello patologico.

Per questi motivi non è ancora stato possibile associare in modo preciso il ruolo di HTLV-2 nelle malattie neurologiche. Non è ancora chiaro se terapie antiretrovirali possano portare benefici agli individui infettati da HTLV-2 (Araujo and Hall., 2004).

La diversa patogenicità di HTLV-1 e HTLV-2 è supportata dai differenti valori di carico provirale che risultano molto più alti nei pazienti infettati da HTLV-1 che da HTLV-2. Infatti, in uno studio condotto da Murphy et al., successivamente confermato da altri, sono stati riscontrati valori di carico provirale pari a $3,28 \log_{10}$ copie per 10^6 PBMC per HTLV-1 contro $2,60 \log_{10}$ copie per 10^6 PBMC per HTLV-2 (Murphy et al., 2004a; Hisada et al., 2005). Nel medesimo studio è stato osservato che nei pazienti infettati dal sottotipo HTLV-2A si riscontrano valori di carico provirale più alti rispetto a quelli infettati da HTLV-2B (Murphy et al., 2004a).

Sono state ottenute evidenze sperimentali circa il fatto che, per HTLV-2, vi sia una correlazione inversa fra età e carico provirale e che questo ultimo sia più basso nelle pazienti di sesso femminile, anche se la questione rimane ancora controversa (Hisada et al., 2005; Roucoux et al., 2005).

Nei pazienti infettati da HTLV-2 si riscontra un aumento a lungo termine del numero totale di linfociti (Yeo et al., 2007).

In un recente studio sono stati seguiti 387 pazienti infettati da HTLV-2 per 14 anni. Questo studio ha permesso di evidenziare in questi soggetti un aumento significativo del numero totale di linfociti, dell'emoglobina e del volume corpuscolare medio rispetto agli individui sieronegativi (Bartman et al., 2008).

4.6 MECCANISMI DI INFEZIONE DI HTLV

La maggior parte degli individui infettati da HTLV-1 rimangono asintomatici per tutta la durata della loro vita. HTLV-1 è in grado di persistere malgrado la forte risposta citotossica CTL (Cytotoxic T lymphocyte) specifica contro il virus che si riscontra in molti individui infettati (Jacobson et al., 1990; Parker et al., 1994). Inoltre, nel siero dei pazienti infettati normalmente non si osserva la presenza di particelle virali libere, proteine ed mRNA (RNA messaggeri) virali (Tochikura et al., 1985; Jacobson et al., 1988b; Bangham, 2003a); queste evidenze suggeriscono che HTLV-1 sia per lo più inattivo a livello trascrizionale. In ogni caso, il fatto che si osservi una risposta CTL HTLV-1-specifica, indica che inizialmente ci deve essere stata espressione di proteine virali.

Sebbene la trascrittasi inversa di HTLV-1 abbia una capacità di commettere errori simile a quelle di altri retrovirus (Mansky, 2000), il genoma del virus è notevolmente stabile (Ina e Gojobori, 1990) e ciò indica che siano avvenuti pochi cicli di replicazione virale. Per questi motivi sembra che HTLV-1 prediliga una condizione di persistenza in cui la maggior parte delle cellule infette, ma probabilmente non tutte, non siano produttive e la gran parte delle nuove cellule infette siano ottenute per divisione di quelle già infette (espansione clonale) piuttosto che ad opera di nuove particelle virali (Salemi et al., 1999; Eiraku et al., 1998; Wattel et al., 1995; Wattel et al., 1996; Bangham, 2003b; Asquith et al., 2005; Asquith et al., 2007).

Il virus ha come bersaglio principale le cellule T ed, in particolare, HTLV-1 ha un tropismo preferenziale per le cellule CD4⁺ (Richardson et al., 1990) e HTLV-2 per le cellule CD8⁺ (Ijichi et al., 1992). Nonostante questo, è stato dimostrato che in pazienti con alto carico provirale sia HTLV-1 che HTLV-2 possono infettare anche

popolazioni di cellule non-T, inclusi monociti e cellule B (Casoli et al., 1995; Koyanagi et al., 1993; Richardson et al., 1990).

L'evento iniziale dell'infezione retrovirale consiste nell'attacco del virus alla membrana cellulare. Il recettore trasportatore ubiquitario del glucosio Glut-1 può funzionare come recettore per HTLV (Manel et al., 2003; Jin et al., 2006). In ogni caso, sono stati proposti distinti recettori cellulari per il legame e l'ingresso dei diversi tipi di HTLV. Per l'infezione delle cellule CD8⁺ da parte di HTLV-2, sembra essere preferito Glut-1, mentre la fusione e l'ingresso di HTLV-1 sembrano essere promossi dal proteoglicano eparina solfato, che si trova particolarmente espresso nelle cellule CD4⁺ (Jones, 2006).

La trasmissione di HTLV ad opera di virioni liberi è altamente inefficiente, mentre risulta molto più efficace la trasmissione per mezzo di cellule infettate. Quando una cellula infettata da HTLV entra in contatto con una non infettata si instaura una "sinapsi virologica" con polarizzazione del MTOC (microtubule-organizing center) alla giunzione cellula-cellula e accumulo delle proteine virali (come Gag) e del genoma virale in questa regione; successivamente, il complesso virale viene trasferito alla cellula ospite (Igakura et al., 2003).

Come per gli altri retrovirus, a partire dal legame alla membrana cellulare, il virione entra nella cellula e libera l'RNA genomico, il quale viene retrotrascritto in DNA provirale ad opera della trascrittasi inversa portata dal virus stesso. Successivamente, l'integrasi virale permette l'integrazione del DNA (che a questo punto viene definito "provirus") nel genoma dell'ospite. Nel caso di HTLV l'integrazione nel genoma avviene in siti casuali del genoma umano (Doi et al., 2005).

Il provirus può rimanere inattivo oppure essere trascritto nuovamente in RNA virale e in mRNA che vengono tradotti in proteine virali strutturali e regolatorie ad opera dell'apparato cellulare.

La fase finale di formazione dei virioni nelle cellule infettate prevede il rivestimento del core virale, all'interno del quale sono contenuti i diversi enzimi e l'RNA genomico, rivestito dalle proteine del capsido. A seguito della gemmazione dalla superficie cellulare si ha la produzione di virioni con un involucro (envelope) costituito da un doppio strato lipidico che deriva dalla membrana plasmatica arricchito di glicoproteine virali (Env). Queste proteine derivano da un precursore che viene tagliato ad opera delle proteasi virali. La proteina Env è costituita da due componenti: una parte

amino-terminale di superficie (SU) e una parte carbossi-terminale transmembrana (TM) con massa apparente rispettivamente di circa 46kDa e 21kDa.

Per facilitare la trasmissione virale, HTLV aumenta clonalmente il numero di cellule infettate per mezzo dell'azione pleiotropica delle sue proteine virali (Yoshida, 2001; Gatza et al., 2003; Jeang et al., 2004; Matsuoka e Jeang, 2005). In questa strategia la proteina transattivatrice Tax svolge un ruolo centrale nell'indurre un aumento del numero di cellule infettate in quanto promuove la proliferazione ed inibisce l'apoptosi cellulare.

4.7 PATOGENESI E RISPOSTA DELL'OSPITE

HTLV-1 induce la trasformazione delle cellule T attivando geni cellulari normalmente coinvolti nella loro crescita e sopravvivenza (Matsuoka, 2003). Alcuni studi hanno dimostrato che l'infezione da HTLV-1 promuove l'espressione di varie citochine e dei loro recettori, in particolare del fattore di crescita delle cellule T interleuchina 2 (IL-2) (Maruyama et al., 1987; Siekevitz et al., 1987; Inoue et al., 1986; Cross et al., 1987), oltre che di molti altri geni cellulari codificanti per inibitori dell'apoptosi, regolatori del ciclo cellulare, recettori del sistema immunitario che derivano dalla famiglia del TNFR (tumor necrosis factor receptor), fattori di trascrizione, molecole per segnali intracellulari e sistemi di riparazione del DNA danneggiato (Harhaj et al., 1999; de La Fuente et al., 2000; Pise-Masison et al., 2002; Koga et al., 2004; Sasaki et al., 2005). Inoltre, HTLV-1 induce l'espressione di geni coinvolti nell'immortalizzazione delle cellule e nella formazione di metastasi (Jeang et al., 2004; Mori et al., 2002; Sinha-Datta et al., 2004). L'azione oncogena di HTLV-1, quindi, coinvolge la modulazione di diversi geni cellulari.

La maggior parte degli individui infettati da HTLV-1 rimane asintomatica per tutta la vita (Osame et al., 1990; Gessain e Gout, 1992). In ogni caso, come detto in precedenza, fra gli individui infettati da HTLV-1 circa l'1-5% sviluppa ATLL, e circa il 4% malattie infiammatorie di cui quella più studiata e caratterizzata è la TSP/HAM. Il motivo di questa differente tendenza a sviluppare malattie non è ancora stata completamente chiarita.

La risposta anticorpale da parte del paziente si scatena entro poche settimane dal momento dell'infezione e rimane attiva per tutta la vita del soggetto infettato.

L'efficienza della risposta CTL da parte del paziente al virus è uno dei fattori più importanti in grado di influire sui livelli di carico provirale (Jeffery et al., 1999; Rafatpanah et al., 2006). Nel caso di una risposta anticorpale efficiente da parte del paziente, le cellule T che esprimono HTLV-1 vengono eliminate da parte della risposta citotossica CTL prima che il virus completi il ciclo di replicazione. In questo modo viene ridotto il carico provirale e, di conseguenza, il rischio di sviluppare malattie infiammatorie come TSP/HAM (Bangham, 2003a; Bangham e Osame, 2005). I fattori che determinano l'efficienza della risposta CTL non sono ancora stati chiariti, sebbene siano stati associati con alcuni geni come HLA di classe I e II ed altri fattori genetici come le citochine (Rafatpanah et al., 2006)

E' stato dimostrato che la risposta immunologica è in grado di causare danni infiammatori ai tessuti nei soggetti affetti da TSP/HAM, in quanto la malattia è generalmente associata ad un alto titolo di anticorpi contro HTLV-1 (Ishihara et al., 1994; Nagai et al., 1998) e ad un'alta frequenza di cellule T attivate (Jacobson et al., 1990; Jacobson et al., 1992; Elovaara et al., 1993; Greten et al., 1998; Jacobson, 2002).

Nei pazienti affetti da TSP/HAM si riscontrano titoli anticorpali più elevati rispetto ai soggetti ATLL. Ciò è probabilmente legato al fatto che nei primi si osserva un'attiva replicazione virale che comporta una forte risposta immunitaria. Al contrario, nei pazienti affetti da ATLL il virus sembra rimanere latente. E' quindi possibile che lo sviluppo dell'ATLL sia legato ad una debole risposta immunitaria, mentre l'insorgenza della TSP/HAM sia associata ad una forte risposta CTL.

L'efficienza della risposta immunitaria sembra quindi essere uno dei fattori in grado di determinare i livelli del carico provirale ed è regolata da geni associati agli alleli HLA. Infatti, sono stati condotti diversi studi sull'influenza degli alleli HLA sulla protezione o la suscettibilità alla TSP/HAM (Osame et al., 1990; Gessain e Gout, 1992; Jeffery et al., 1999; Jeffery et al., 2000; Catalan-Soares et al., 2009). E' stato osservato che alcuni di essi sono associati con un rischio minore di sviluppare questa patologia e con bassi valori di carico provirale in pazienti asintomatici (Jeffery et al., 1999), mentre altri sono in grado di predisporre alla TSP/HAM (Jeffery et al., 2000).

4.8 ASPETTI TERAPEUTICI E VACCINI

Nonostante siano passati ormai circa 30 anni dalla descrizione iniziale dell'ATLL, la prognosi di questa malattia rimane ancora difficile da definire: ciò è legato alla resistenza alle terapie convenzionali da parte delle cellule T neoplastiche e alla compromissione immunologica dei pazienti (Taylor e Nicot, 2008).

Le terapie si rivelano efficaci solo in pochi casi e spesso il paziente è soggetto a ricadute. In particolare, il trattamento chemoterapico dell'ATLL porta raramente a risultati soddisfacenti e la sopravvivenza media si aggira fra i 3 ed i 15 mesi. Anche terapie basate sull'impiego di anticorpi monoclonali e farmaci antitumorali non hanno dato risposte positive stabili. Al momento, il trapianto di midollo osseo sembra essere il trattamento più promettente (Taylor e Matsuoka, 2005).

Sono state tentate, inoltre, anche terapie basate sull'impiego di farmaci antiretrovirali. Sono stati ottenuti risultati incoraggianti soprattutto con trattamenti in combinazione di interferone alfa e antiretrovirali come zidovudina (AZT) (Kchour et al., 2007) e triossido d'arsenico (ATO) (Ishitsuka et al., 2007). Anche i trattamenti con inibitori della trascrittasi inversa come lamivudina portano alla diminuzione del carico provirale (Taylor et al., 1999).

Negli ultimi venti anni sono stati condotti diversi studi allo scopo di comprendere le caratteristiche biologiche e patogeniche di HTLV-1. Questi studi hanno permesso di sviluppare diverse strategie vaccinali e terapeutiche per combattere l'infezione basate su peptidi, proteine ricombinanti, DNA e vettori virali. In questi anni sono stati analizzati epitopi basati sulla glicoproteina Env per l'induzione di anticorpi neutralizzanti. Inoltre sono state sviluppate strategie per generare una risposta CTL polivalente contro l'antigene di Tax di HTLV-1 (Lynch e Kaumaya, 2006).

I conigli si sono rivelati suscettibili all'infezione da HTLV-1 (Hayami et al., 1985) ed è stato dimostrato l'effetto protettivo dell'immunizzazione passiva in questo modello animale sia con linee cellulari di topo trasformate con HTLV-1 (Takehara et al., 1989) che con vettori virali ricombinanti (Hakoda et al., 1995; Franchini et al., 1995).

E' stato dimostrato che anche le scimmie *Saimiri sciureus* sono suscettibili all'infezione con cellule immortalizzate infettate da HTLV-1 (Kazanji et al., 1997). L'immunizzazione di questi animali con vaccini composti da epitopi virali specifici per

cellule B e T ha indotto una risposta immune umorale e cellulare e una riduzione del carico provirale (Kazanji et al., 2006)

4.9 COINFEZIONE HIV-1/HTLV

Il problema della coinfezione da HIV-1 e HTLV è diventato di interesse mondiale negli ultimi 10 anni in quanto il numero di pazienti coinfectati da HIV-1 e HTLV-1 nel Sud America e nell'Africa sta aumentando, come pure i casi di coinfezione da HIV-1 e HTLV-2 negli Stati Uniti e in Europa (Casoli et al., 2007).

La coinfezione si riscontra spesso in persone con precedenti di utilizzo di droghe per via endovenosa.

L'influenza della coinfezione da HTLV-1 e HTLV-2 sulla progressione di HIV-1 è differente in quanto i due virus hanno un tropismo diverso per le cellule T.

L'effetto della coinfezione con HTLV-1 sulla patogenesi di HIV-1 è ancora controverso in quanto alcuni fattori solubili prodotti dalle cellule infettate da HTLV-1 possono sia incrementare che sopprimere l'infezione da HIV-1. In questi pazienti la sovraespressione di HIV-1 è stata attribuita alla forte attivazione delle citochine che promuovono l'infezione di HIV-1 (Casoli et al., 2007).

Il problema dell'influenza della coinfezione con HTLV-2 sulla progressione dell'AIDS è stato recentemente oggetto di diversi studi e sono state ottenute evidenze circa il fatto che HTLV-2 possa esercitare un ruolo protettivo stabilizzando il numero di cellule CD4+ e CD8+, abbassando la replicazione di HIV e l'attivazione immunitaria, prolungando la sopravvivenza e diminuendo la progressione all'AIDS. In questo meccanismo un ruolo fondamentale è stato attribuito alla modulazione delle citochine, ed in particolare ad alcune chemochine come CCL3, stimolata da HTLV-2 (Casoli et al., 2007; Bassani et al., 2007). Infatti, studi recenti hanno dimostrato che il fattore CCL3L1, una isoforma di CCL3 con una forte attività inibitoria verso alcuni ceppi di HIV-1 (Menten et al., 2002), viene naturalmente indotto in presenza di HTLV-2, particolarmente nei pazienti LTNP (Long Term Non Progressor) coinfectati con mancata progressione dell'AIDS (Pilotti et al., 2007). Ciò è in accordo con la capacità di CCL3L1 di inibire la replicazione di HIV-1 agendo sia sul processo di infezione che sulla progressione della malattia (Tosi et al. 2006, Pilotti et al., 2007). Il meccanismo attraverso il quale HTLV-2 è in grado di interferire con il processo infettivo di HIV-1 è

illustrato schematicamente nella Fig. 2; l'infezione delle cellule CD8+ da parte di HTLV-2 e la loro espansione induce la secrezione delle chemochine CC che sono in grado di rafforzare la risposta CTL contro le cellule CD4+ infettate da HIV-1 (Casoli et al, 2007).

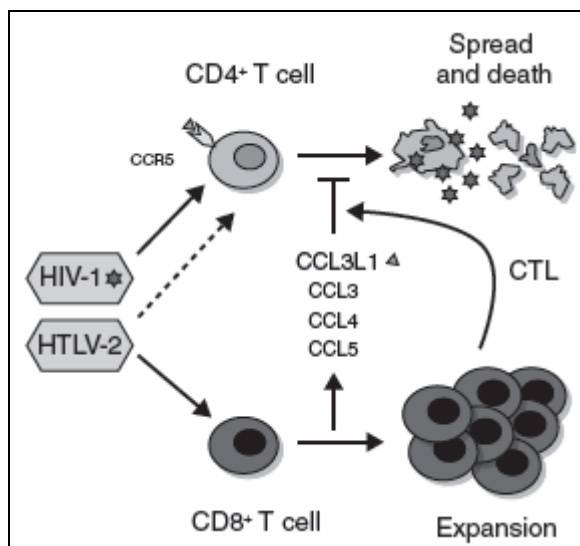


Fig 2 Meccanismo dell'interferenza di HTLV-2 con il processo infettivo di HIV-1 (Casoli et al, 2007).

In uno studio condotto per un lungo periodo di tempo su più di 3500 soggetti coinfectati HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2 negli Stati Uniti (Beilke et al., 2007) si è dimostrato che questi pazienti vanno spesso incontro a complicazioni neurologiche, trombocitopenia, infezioni ai tratti urinari e respiratori ed epatite C (Araujo et al., 2002b; Beilke et al., 2004).

In uno studio retrospettivo caso-controllo condotto in Brasile, la coinfezione di HIV-1 e HTLV-1 è risultata associata ad una diminuzione del tempo di sopravvivenza (Brites et al., 2001).

Recentemente, è stato osservato un aumento dell'incidenza di malattie epatiche e di positività all'HCV (Hepatitis C Virus) tra soggetti coinfectati da HIV-1 ed HTLV-2, ma non di mielopatie, neuropatie periferiche, bronchiti ed infezioni del tratto urinario (Turci et al., 2006).

L'introduzione delle terapie HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) ha drammaticamente ridotto l'infettività e la mortalità degli individui infettati da HIV-1, ma, portando ad un numero maggiore dei casi di sindromi infiammatorie (Shelburne et

al., 2006), risulta anche nell'aumento di malattie neurologiche nei pazienti coinfectati da HTLV (Casoli et al., 2007). Ne risulta che queste terapie sono efficaci nel controllo delle malattie causate da HIV-1 ma hanno scarso effetto su HTLV-1/2.

Inoltre, è stato osservato un aumento del carico provirale a seguito dell'inizio di terapie HAART (Machuca et al., 2001; Murphy et al., 2003). Risultati ottenuti in collaborazione con il nostro gruppo di ricerca hanno confermato che a seguito di trattamenti con farmaci antiretrovirali il carico provirale di HTLV-2 aumenta e ciò suggerisce che ci sia una espansione delle cellule infettate (Turci et al., 2006).

E' stato riportato un unico caso di mielopatia simile alla sindrome TSP/HAM in un paziente coinfectato da HTLV-2 e HIV-1 proveniente da una coorte di 677 IDU spagnoli (Toro et al., 2007).

Il nostro laboratorio, in collaborazione con altri, lavora da anni allo studio della progressione dell'AIDS in pazienti coinfectati da HIV-1 e HTLV-2 e in soggetti monoinfectati da HIV-1 utilizzando parametri virologici, clinici ed immunologici (Turci et al., 2006; Casoli et al., 2007). In uno screening di una coorte di 4292 IDU, 2427 individui sono risultati positivi all'HIV-1 e, fra questi, 165 (il 6,8%) sono risultati coinfectati da HTLV-2.

Sono state riscontrate considerevoli variazioni per quanto riguarda la positività ad HTLV-2 in diverse coorti italiane di IDU positivi ad HIV-1. Sono state rilevate percentuali alte nelle grandi aree metropolitane e più basse nei piccoli centri. Fra i pazienti HIV-1 negativi ne sono stati rilevati 20 monoinfectati da HTLV-2 (1,1 %). E' interessante osservare come la sieropositività ad HTLV-2 sia più significativa fra i soggetti HIV-1 positivi (6,8 %) che fra quelli HIV-1 negativi (1,1%). Un unico soggetto HIV-1 negativo di origine asiatica è risultato positivo ad HTLV-1.

In questo studio è stata monitorata la progressione dell'AIDS per circa 15 anni, sia per i pazienti monoinfectati da HIV-1 che per quelli coinfectati da HIV-1 e HTLV-2. Per questi ultimi il numero di cellule CD4+ e CD8+ è risultato superiore rispetto ai soggetti infettati solo da HIV-1. All'interno del gruppo di pazienti coinfectati è stato identificato un sottogruppo di soggetti con caratteristiche tipiche dei long-term nonprogressor per l'AIDS (in termini di numero di cellule CD4 e viremia di HIV) che, nel corso dello studio, non hanno sviluppato infezioni opportunistiche e non hanno necessitato di terapie antiretrovirali. Inoltre, è stato osservato che, mediamente, il carico provirale di HTLV-2 nel gruppo di individui coinfectati non sottoposti ad alcuna terapia antiretrovirale non era significativamente differente da quello rilevato nei pazienti

monoinfettati; ciò ha portato ad ipotizzare che l'infezione da HIV-1 non abbia alcuna influenza sul carico provirale di HTLV-2. Recentemente è stato confermato che la coinfezione con HTLV-2 può esercitare un ruolo protettivo nei confronti della progressione delle malattie causate da HIV diminuendo la sua replicazione e l'attivazione del sistema immunitario (Bassani et al., 2007).

Lo studio condotto all'interno del nostro laboratorio ha permesso di monitorare anche l'andamento dell'infezione di HIV-1 e HTLV-2. Come è possibile osservare dalla Fig. 3 la percentuale di individui infettati da HTLV-2 non è diminuita rapidamente come per HIV-1. Infatti, nel corso dal 1988 al 2005, i soggetti appartenenti alla coorte italiana di IDU infettati da HIV-1 è scesa dal 40% all'8%, mentre il numero di individui infettati da HTLV-2 è passata dal 4% al 2% (Casoli et al., 2007).

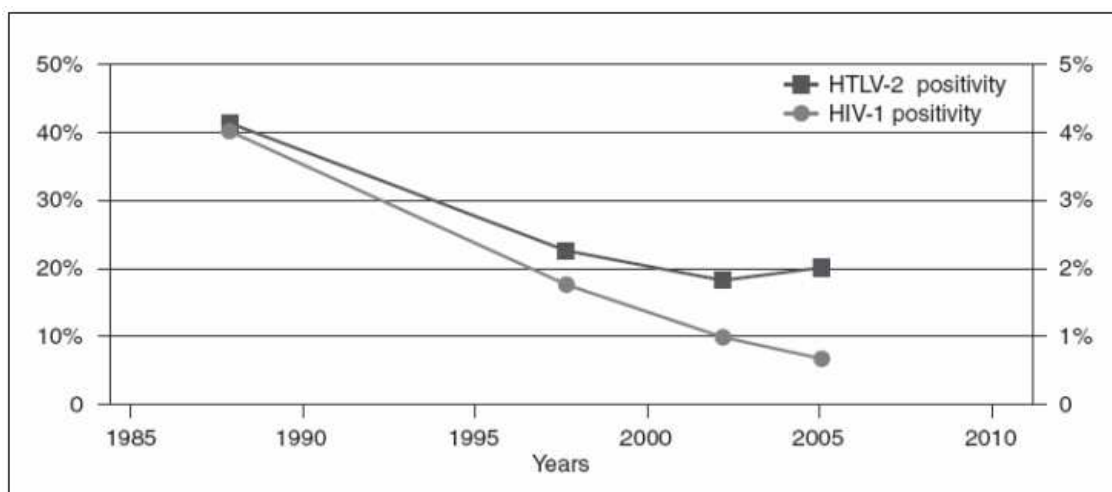


Fig. 3. Monitoraggio di una coorte italiana di 2500 IDU per un periodo di circa 20 anni. La percentuale di individui infettati da HIV-1 è rappresentata dalla linea più chiara e quella degli individui infettati da HTLV-2 dalla linea più scura. Il monitoraggio è stato eseguito in accordo con gli usuali screening per HIV-1 e con l'algoritmo HERN per HTLV-2 (Casoli et al., 2007).

4.10 ORGANIZZAZIONE GENICA E TRASCRIZIONE

I retrovirus HTLV hanno un genoma costituito da due copie identiche di RNA a singolo filamento (ssRNA) di circa 9 Kb (Seiki et al., 1983).

Le strutture geniche di HTLV-1 (Fig. 4) e HTLV-2 (Fig. 5) sono molto simili e mostrano un'omologia di sequenza nucleotidica di circa il 70%.

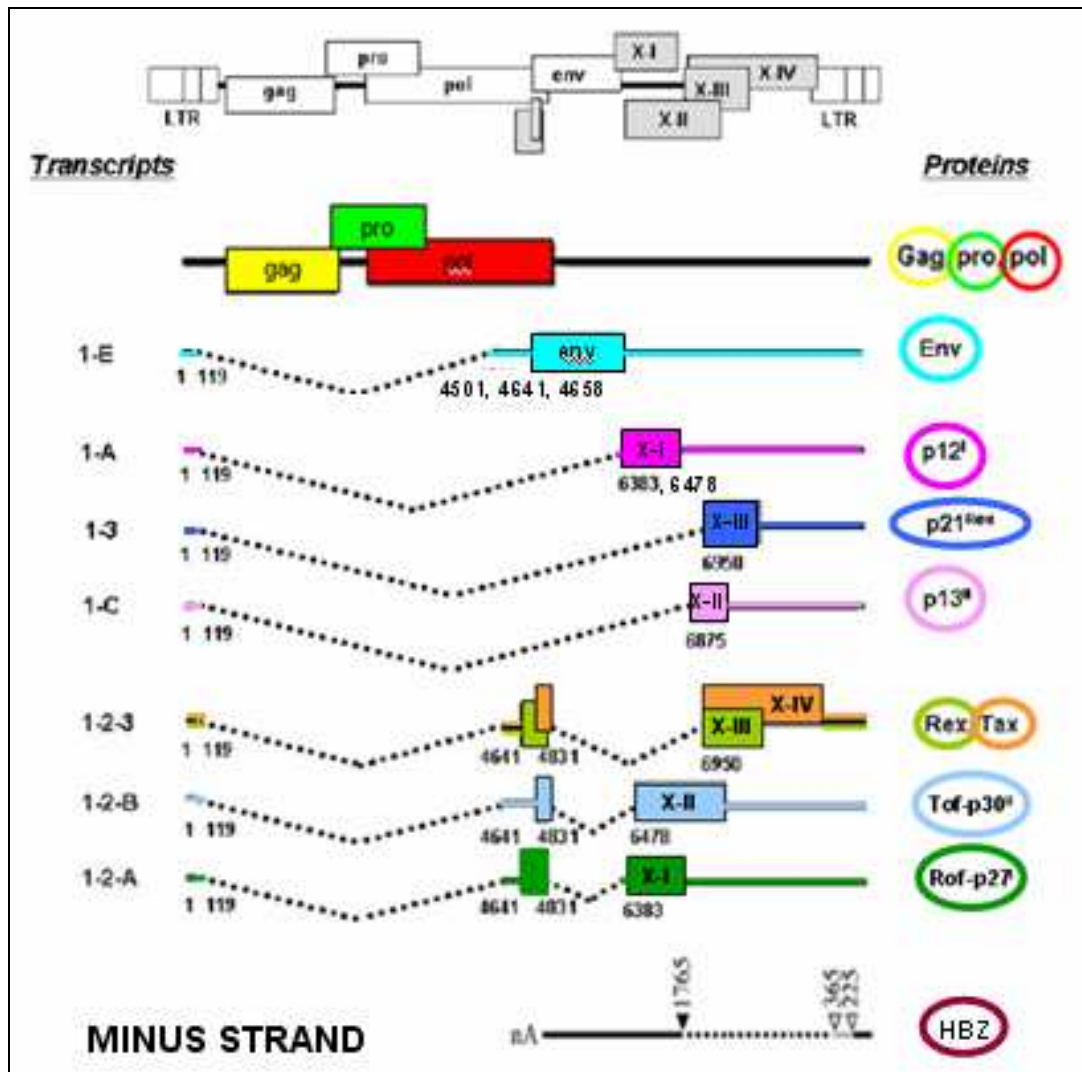


Fig. 4. Organizzazione genica di HTLV-1 e suoi mRNA. HTLV-1 esprime 8 trascritti dal filamento positivo ed un trascritto dal filamento negativo. Il mRNA che non subisce splicing codifica per le proteine Gag, Pol e Pro. Quattro mRNA che subiscono un singolo splicing danno origine alle proteine Env, p12, p21^{rex} e p13. I tre mRNA che subiscono doppio splicing danno origine alle proteine Tax, Rex, p30 e Rof-p27. Solo una proteina (HBZ) viene prodotta dal trascritto antisense che subisce un unico splicing.

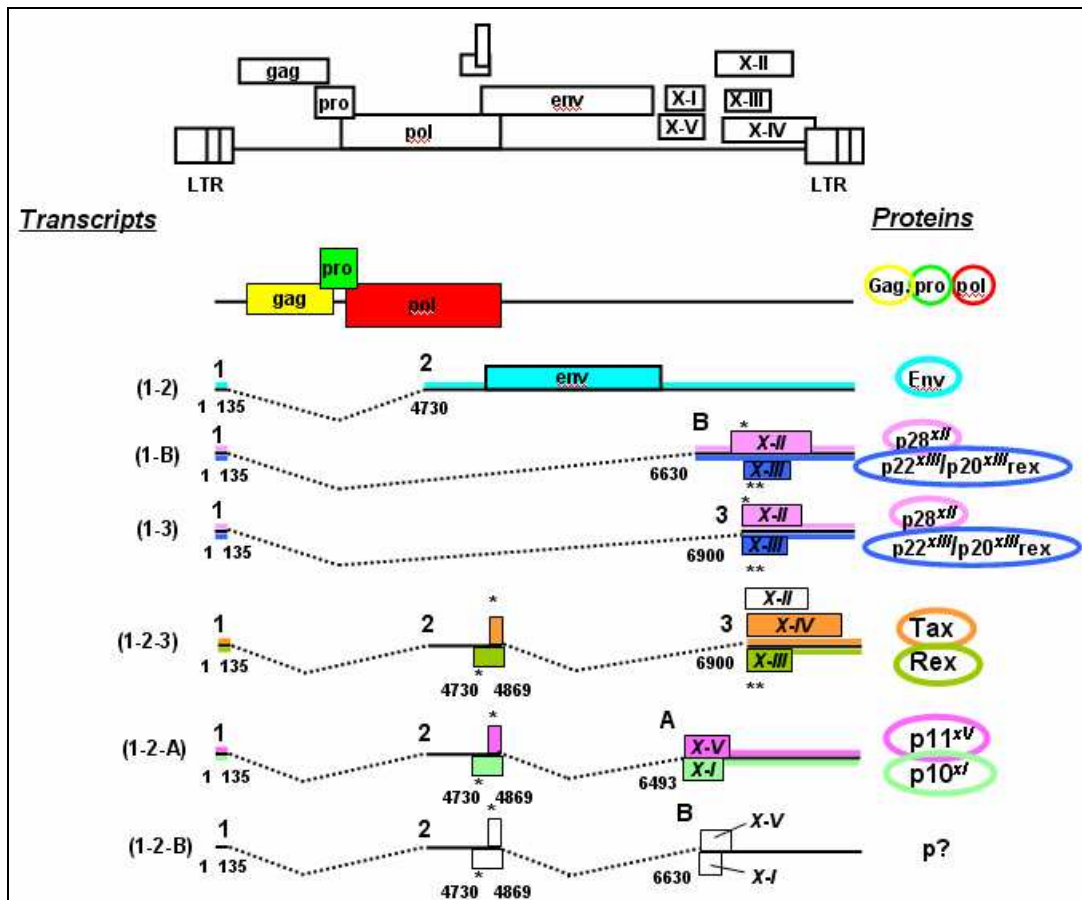


Fig. 5. Organizzazione genica di HTLV-2 e relativi mRNA. HTLV-2 esprime 7 trascritti, tutti dal filamento con polarità positiva. Il mRNA che non subisce splicing codifica per le proteine Gag, Pol e Pro. Tre mRNA che subiscono un singolo splicing danno origine alle proteine Env, p28,p22/p20rex-1 e p28,p22/p20rex-2. I tre mRNA che subiscono doppio splicing danno origine alle proteine Tax, Rex, p11, p10 e p? (putativa e non caratterizzata).

Il DNA provirale è fiancheggiato ad entrambe le estremità dalle sequenze ripetute LTR (long terminal repeat) che consentono l'integrazione nel DNA cellulare e la regolazione dell'espressione virale (Rosen et al., 1985; Shimotohno et al., 1986; Brady et al., 1987). Sebbene le sequenze LTR di HTLV-1 e HTLV-2 siano abbastanza diverse, le regioni regolatrici specifiche all'interno di esse sono altamente conservate.

I geni virali di HTLV, come nella maggior parte dei retrovirus, codificano per le proteine del core (Gag), dell'envelope (Env), per la polimerasi (Pol) e proteasi (Pro). Il genoma di HTLV contiene una regione addizionale, chiamata pX, che si trova tra il gene *env* e il 3' LTR. Questa regione è costituita da diversi quadri di lettura aperti (ORF) parzialmente sovrapposti che codificano per proteine regolatorie, come Tax e Rex, ed accessorie. A partire da questa regione vengono prodotte proteine diverse per HTLV-1 e HTLV-2 (Tab. 1).

ORF	HTLV-1	HTLV-2
<i>x-I</i>	Rof p12 ^{xI}	p10 ^{xI} —
<i>x-II</i>	tof (p30 ^{xII}) p13 ^{xII}	p28 ^{xII} —
<i>x-III</i>	rex1 p21rex	rex2 p22/p20rex ^{xIII}
<i>x-IV</i>	tax1	tax2
<i>x-V</i>	—	p11 ^{xV} p?
MINUS STRAND	HBZ	—

Tab. 1. Schema riassuntivo delle proteine prodotte dalle diverse ORF contenute nella regione pX di HTLV-1 e HTLV-2.

Sia HTLV-1 che HTLV-2 esprimono le proteine strutturali ed enzimatiche Gag, Pol e Pro dal mRNA che non subisce alcuno splicing (Fig. 4 e Fig. 5) (Lee et al, 1984; Nam et al., 1988).

Env viene espressa da un mRNA che va incontro ad un singolo splicing (Paine et al., 1994). Questa proteina svolge un ruolo fondamentale nel riconoscimento del recettore e nell'infezione della cellula bersaglio. Env è anche il determinante per il differente tropismo dei due virus (Xie e Green, 2005).

Dal mRNA che subisce doppio splicing sia HTLV-1 che HTLV-2 producono le proteine regolatorie Tax e Rex da due ORF parzialmente sovrapposte della regione pX. Tax, di cui si parlerà più dettagliatamente in seguito, aumenta la velocità di trascrizione dei mRNA virali a partire dalle LTR (Cann et al., 1985; Felber et al., 1985; Inoue et al., 1987) e modula anche la trascrizione e l'attività di numerosi geni cellulari coinvolti nella crescita e nella differenziazione delle cellule, nel controllo del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA (Leung e Nabel, 1988; Mulloy et al., 1998; Ressler et al., 1997; Schmitt et al., 1998; Siekevitz et al., 1987). Esistono evidenze che Tax svolga un ruolo fondamentale nella trasformazione cellulare e nell'oncogenesi (Feuer e Green, 2005; Robek e Ratner, 1999; Ross et al., 2000). Rex agisce a livello post-trascrizionale legandosi, stabilizzando ed esportando selettivamente dal nucleo al citoplasma gli mRNA virali che contengono ancora gli introni (Younis e Green, 2005).

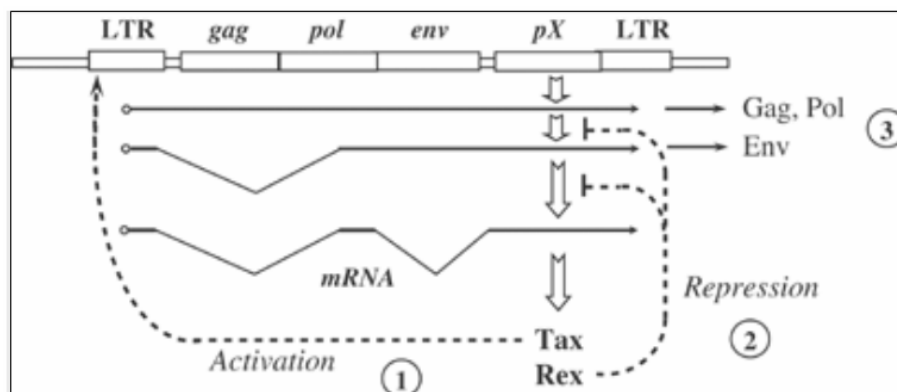


Fig. 6. Regolazione dell'espressione genica da parte di Tax e Rex (Yoshida, 2005).

Nella Fig. 6 è riportato uno schema riassuntivo del meccanismo di regolazione dell'espressione genica operato da parte di Tax e di Rex. Inizialmente vi è una induzione dell'espressione virale di Tax che, a sua volta, transattiva la trascrizione del genoma virale (1). Successivamente, Rex, codificata dallo stesso trascritto di Tax ma in un ordine di lettura diverso, reprime lo splicing del RNA virale (2). Come conseguenza, vengono, infine, espressi i trascritti che non subiscono splicing e prodotte le proteine strutturali (3). La soppressione dello splicing riduce il livello degli mRNA che subiscono doppio splicing, tra cui lo stesso trascritto di Tax, e si ha quindi una inibizione dell'espressione genica virale (Hidaka et al., 1988; Seiki et al., 1988; Yoshida, 2005).

La funzione delle forme troncate amino-terminali di Rex (p21rex per HTLV-1 e p22/p20rex in HTLV-2), che vengono prodotte da un mRNA che subisce un singolo splicing, non è stata ancora completamente chiarita, ma vi sono evidenze che possano interferire con la localizzazione e la funzione della proteina Rex (Ciminale et al., 1997; Kubota et al., 1996; Shuh et al., 1999).

Per quanto riguarda HTLV-1, le proteine p12 e p27 sono codificate dalla ORF I e p13 e p30 dalla ORF II. Il mRNA per la proteina p12, potenzialmente, può essere prodotto sia da un singolo che da un doppio splicing. Questa proteina si localizza nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi e attiva le cellule regolando la via di segnalazione del calcio (Ding et al., 2001; Ding et al., 2003). Inoltre, favorisce l'adesione LFA-1 delle cellule T (Kim et al., 2006) e si associa con proteine cellulari come la subunità di 16 KDa dell'ATPasi vacuolare, le catene β e γ del recettore dell'IL-2 e la catena pesante dell'MHC di classe I (Johnson et al., 2000; Koralnik et al., 1995; Nicot et al., 2001). Sebbene sia noto che p27 viene espressa sia *in vivo* (Pique et al., 2000) che *in vitro* (Ciminale et al., 1992), la sua precisa funzione non è ancora stata

chiarita. La proteina p30 viene prodotta da un mRNA sottoposto a doppio splicing. E' un regolatore multifunzionale che modula in modo diverso l'espressione a livello trascrizionale di geni virali e cellulari mediante l'associazione con p300/CBP e TIP60 (Awasthi et al., 2005; Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2001) e a livello post-trascrizionale per mezzo del legame e della ritenzione del mRNA di tax/rex nel nucleo (Nicot et al., 2004; Younis et al., 2006; Younis et al., 2004). Sebbene p30 non sia necessaria *in vitro* per la replicazione e la trasformazione cellulare (Derse et al., 1997; Robek et al., 1998), è indispensabile per promuovere la sopravvivenza del virus e la persistenza in conigli infettati (Silverman et al., 2004). La proteina accessoria p13, che viene prodotta da un mRNA che va incontro ad un singolo splicing, si localizza nella membrana interna dei mitocondri e può causare alterazioni della morfologia e della funzione dei mitocondri stessi (Ciminale et al., 1999; D'Agostino et al., 2005). Questa proteina è in grado di sopprimere la crescita cellulare *in vitro* e gioca un ruolo biologico fondamentale durante le fasi precoci di infezione *in vivo* (Silic-Benussi et al., 2004; D'Agostino et al., 2005; Hilaragi et al., 2006;).

Nel caso di HTLV-2, le proteine accessorie includono p10, codificata dalla ORF I, p28 dalla ORF II, e p11 dalla ORF V (Ciminale et al., 1995). La proteina p28, che potenzialmente può essere espressa da due distinti mRNA (che possono codificare entrambi anche per p22/p20rex) che vanno incontro a singolo splicing, è in parte omologa dal punto di vista funzionale alla proteina p30 di HTLV-1. Questa proteina è in grado di reprimere la replicazione virale a livello post-trascrizionale trattenendo nel nucleo il mRNA di Tax/Rex (Younis et al., 2004). Le proteine p10 e p11 vengono prodotte dallo stesso mRNA, sottoposto a doppio splicing, in ORF separate ma sovrapposti. Sebbene si conosca poco circa il ruolo svolto da queste due proteine, sembra che p10, similmente a p12 di HTLV-1, si leghi alle catene libere dell'MHC-I (Major Histocompatibility Complex di classe I) ma non alle catene β e γ dell'IL-2R (interleukin-2 receptor) (Johnson et al., 2000) e che p11 si leghi alla catena pesante del MHC-I (Johnson et al., 2001).

HTLV-1 esprime anche un mRNA dal filamento negativo che subisce un singolo splicing e viene trascritto da un promotore funzionale presente nel filamento antisense del genoma provirale (Cavanagh et al., 2006; Larocca et al., 1989). Questo trascritto codifica per la proteina HBZ (HTLV-1 *b*-ZIP factor) e non si ritrova in HTLV-2. HBZ interagisce con fattori cellulari come JunB, JunD, CREB e CBP/300 per modulare la trascrizione (Hivin et al., 2007; Kuhlmann et al., 2007; Clerc et al., 2008). HBZ ha una

funzione bimodale in quanto svolge la sua azione sia come proteina che come RNA (Mesnard et al., 2006). L'espressione del gene *Hbz* è stata anche collegata alla proliferazione cellulare (Arnold et al., 2008; Satou et al., 2006; Yoshida et al., 2008)

Recentemente è stato pubblicato un lavoro che analizza la cinetica dell'espressione di HTLV-1 in cellule trasfettate in modo transiente con un plasmide contenente l'intero provirus, in PBMC umani originariamente sani ed successivamente infettati e in PBMC di conigli infettati (Li et al., 2009). In questo studio, grazie alla metodica Real-Time RT-PCR, è stato osservato un profilo di espressione genica di HTLV-1 simile nelle cellule infettate e in quelle trasfettate in modo transiente: tutti i trascritti hanno mostrato un andamento crescente nel tempo fino al raggiungimento e al mantenimento di un livello stabile. Gli mRNA *gag/pol*, *tax/rex* e *env* hanno mostrato un'espressione precoce e consistente, mentre l'espressione dei geni accessori, incluso *Hbz*, è risultata di 1-4 ordini di grandezza inferiore rispetto a quella di *tax/rex*. Nei conigli infettati gli mRNA *tax/rex* e *gag/pol* hanno mostrato un picco di espressione immediatamente dopo l'inoculo con una progressiva diminuzione inversamente proporzionale al carico provirale e alla risposta anticorpale contro le proteine virali. Il mRNA *Hbz* è stato rilevato già ad una settimana dall'infezione ed ha mostrato un andamento crescente fino alla stabilizzazione. Questo lavoro ha messo in luce una relazione inversamente proporzionale dell'espressione di *tax/rex* e *Hbz* nel tempo, fornendo la prima evidenza del legame fra l'espressione di *Hbz* e il carico provirale, e della sopravvivenza delle cellule infettate in un ospite.

4.11 LE PROTEINE TAX-1 E TAX-2

La proteina Tax di HTLV, che ha una massa di 40 KDa, è un fattore di trascrizione pleiotropico che agisce come dimero (Jin e Jeang, 1997; Basbous et al., 2003). Fu inizialmente scoperta come transattivatore della trascrizione dei propri geni virali a partire da un promotore situato nella regione U3 della LTR in 5' (Felber et al., 1985; Chen et al., 1985; Fujisawa et al., 1985). Successivamente, furono evidenziate le sue capacità di modulazione dell'espressione e della funzione di svariate proteine regolatrici cellulari (Jeang, 2001; Iha et al., 2000; Bex e Gaynor, 1998). La proteina Tax di HTLV-1 (Tax-1) è coinvolta nell'espressione di più di cento geni attraverso

interazioni con attivatori trascrizionali, fattori di trascrizione basali e proteine coinvolte nel riarrangiamento della cromatina (Ng et al., 2001).

Tax presenta le caratteristiche che sono proprie delle oncoproteine virali ed è stato dimostrato che è in grado di svolgere un ruolo importante nella patogenesi di HTLV, essendo capace di attivare le cellule T e la loro proliferazione (Hollsberg et al., 1994). Utilizzando cloni molecolari infettivi, è stato possibile dimostrare che Tax è necessaria per indurre la trasformazione delle cellule T primarie umane (Ross et al., 1996; Robek e Ratner, 1999). Inoltre, Tax è in grado di interferire con i meccanismi di riparazione del DNA e di controllo del ciclo cellulare e di modulare il processo di apoptosi (Hollsberg et al., 1994; Marriott e Semmes, 2005).

Studi condotti recentemente *in vivo* hanno dimostrato che questa proteina, espressa in topi transgenici, è in grado di portare alla formazione di linfomi (Hasegawa et al., 2006; Ohsugi et al., 2007).

4.11.1 La struttura di Tax

Tax-1 e Tax-2 presentano un'omologia a livello di sequenza aminoacidica di circa il 78% (Feuer e Green, 2005). Tax-1 è costituita da 353 aminoacidi in tutti i sottotipi di HTLV-1, mentre in HTLV-2, le proteine Tax dei diversi sottotipi presentano delle differenze: Tax-2B, 2C e 2D (rispettivamente dei sottotipi B, C e D) sono simili, ma non identiche, dato che hanno diverse dimensioni (rispettivamente di 356, 356 e 344 aminoacidi), e Tax-2A è di dimensioni inferiori (331 aminoacidi).

I cloni di Tax-1 e Tax-2A mostrano una notevole somiglianza per quanto riguarda la transattivazione trascrizionale per mezzo delle vie CREB/ATF e NF-κB (Ross et al., 1997; Lewis et al., 2002). Analisi condotte con l'impiego di mutanti e allineamenti di sequenza aminoacidica hanno mostrato che i domini importanti di Tax-1 e Tax-2 per la transattivazione mediante queste due vie di segnalazione sono simili, anche se non identici (Fig 7) (Smith e Greene, 1990; Semmes e Jeang, 1992; Semmes e Jeang, 1996; Ross et al., 1997). In particolare, alle estremità C- ed N-terminali si trovano i segnali per la transattivazione CREB/ATF, mentre nella porzione centrale della proteina vi sono i domini di attivazione NF-κB (Azran et al., 2004) (Fig. 7).

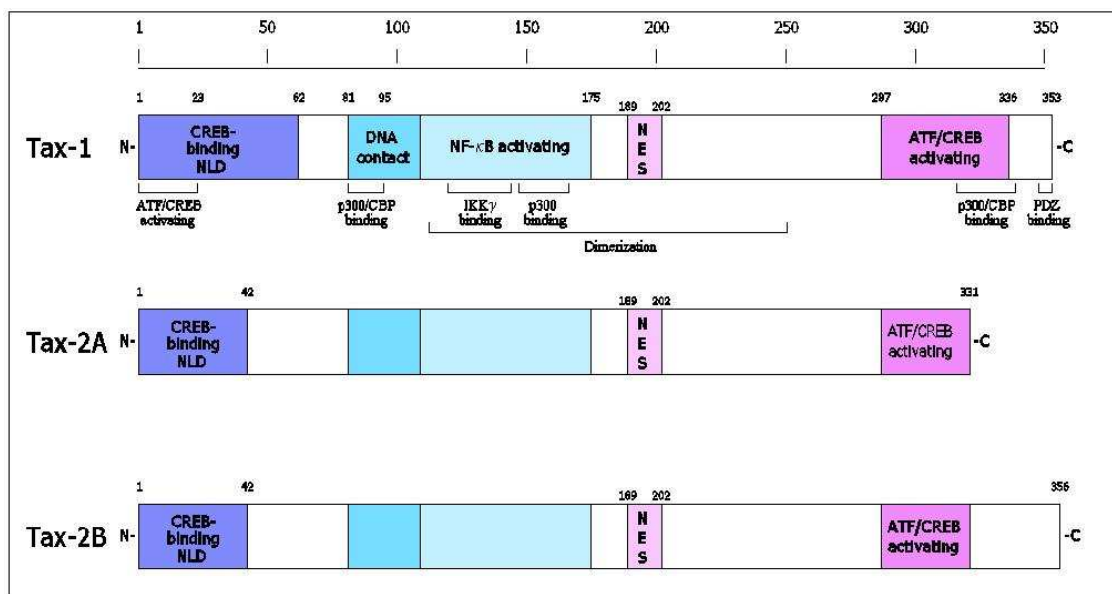


Fig. 7. Domini strutturali e funzionali di Tax-1 e Tax-2A.

Il motivo “Zinc finger” presente nella regione N-terminale di entrambe le proteine permette la loro associazione con cicline (Haller et al., 2002), nucleoproteine (Tsuji et al., 2007), subunità del proteasoma (Rousset et al., 1996) e fosfatasi PP2A (Fu et al., 2003).

In Tax-1, un dominio presente fra gli aminoacidi 55 e 95 regola l’interazione della proteina con i fattori CBP/p300 (Harrod et al., 2000).

Sia Tax-1 che Tax-2 contengono un dominio nella regione centrale della proteina deputato alla dimerizzazione (Jin e Jeang, 1997; Xiao et al., 2000).

Nella porzione C-terminale della proteina Tax-1 è presente una sequenza di legame al dominio PDZ che non si osserva per Tax-2. PDZ è uno dei moduli di interazione proteina-proteina comunemente utilizzati nelle cellule eucariotiche. Le proteine contenenti questo dominio, a seguito del riconoscimento di una sequenza di legame specifica in altre proteine, svolgono un ruolo fondamentale nel reclutamento e organizzazione di proteine regolatrici nei siti coinvolti nella segnalazione cellulare e in quelli deputati alla polarizzazione a seguito del contatto cellula-cellula (Fanning e Anderson, 1999; Harris e Lim, 2001; Sheng e Sala, 2001). Nel caso di Tax-1, inoltre, l’interazione con diverse proteine contenenti il dominio PDZ svolge un ruolo fondamentale nella proliferazione delle cellule indotta da HTLV-1 e nell’instabilità genetica *in vitro*, e facilita la persistenza virale *in vivo* (Hung e Sheng, 2002; Xie et al., 2006).

Tax-1 e Tax-2 mostrano una diversa capacità nell'indurre la trascrizione genica cellulare (Tanaka et al., 1990; Ejima et al., 1993; Mori e Prager, 1996; Ye et al., 2003). E' stato infatti dimostrato che Tax-1 ha un'attività transattivante intrinseca per le LTR virali superiore rispetto a Tax-2 (Ye et al., 2003). Ciò può aumentare non solo l'espressione genica virale e l'infettività, ma anche l'espressione dei geni cellulari che sono indotti da Tax.

4.11.2 Interazione di Tax con proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale

Tax-1 è in grado di modulare l'espressione genica cellulare e virale interagendo con i componenti di molte vie di trasduzione del segnale, come i fattori di trascrizione NF- κ B, CREB, SRF e AP-1, promuovendo l'attivazione cellulare, la proliferazione, riarrangiamenti del citoscheletro e la formazione di sinapsi virologiche. Nella Fig. 8 sono rappresentate schematicamente alcune di queste interazioni.

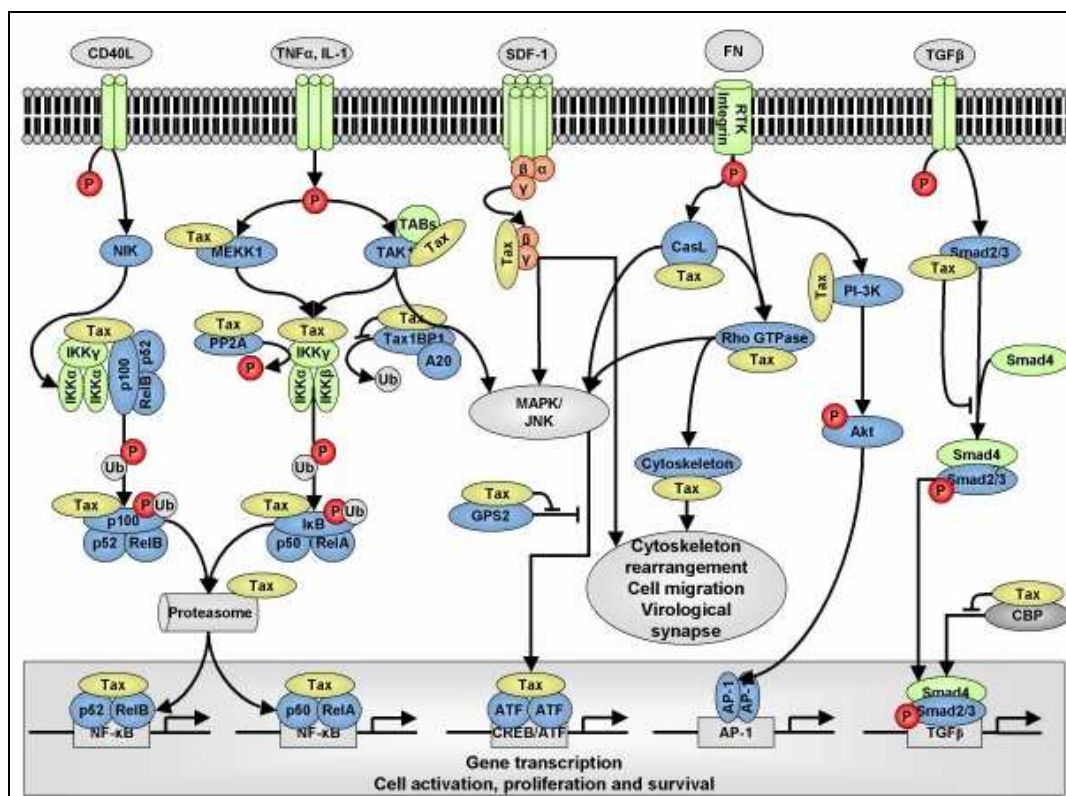


Fig. 8. Rappresentazione schematica delle interazioni di Tax-1 con componenti di vie di trasduzione del segnale (Boxus et al., 2008).

4.11.2.1 Via di segnalazione CREB/ATF

Come detto in precedenza, Tax fu inizialmente scoperta come transattivatore dell'espressione genica di HTLV-1 (Felber et al., 1985). Questa proteina è in grado di attivare le LTR virali a partire da tre elementi di sequenze ripetute conservate di 21 bp, chiamate elementi di risposta a Tax (TxRE) (Fig. 9) (Brady et al., 1987). La sequenza consenso di queste regioni è omologa a quella degli elementi di risposta all'AMP ciclico (cAMP), chiamati CRE (Jeang et al., 1988; Bantignies et al., 1996). Tax-1 mostra una bassa affinità per il DNA e non si lega direttamente agli elementi TxRE (Giam e Xu, 1989) ma interagisce con i fattori CREB/ATF (CRE-binding/activating transcription factors) facilitandone il legame con le relative sequenze consenso. La formazione di questo complesso sembra essere determinante per il reclutamento di fattori di trascrizione quali p300 e CBP ("CREB binding protein") (de la Fuente et al., 2006).

Tax-1, grazie all'interazione con i fattori CREB/ATF, è in grado di attivare l'espressione di geni sia virali che cellulari. In particolare, i membri della famiglia CREB/ATF sono implicati nella sopravvivenza cellulare e nell'apoptosi dato che regolano la trascrizione genica diretta da CRE in risposta a segnali ambientali come fattori di crescita o di stress (Hai e Hartman, 2001; Persengiev e Green, 2003). Queste proteine svolgono, inoltre, un ruolo importante nel processo oncopatogenetico (Persengiev e Green, 2003).

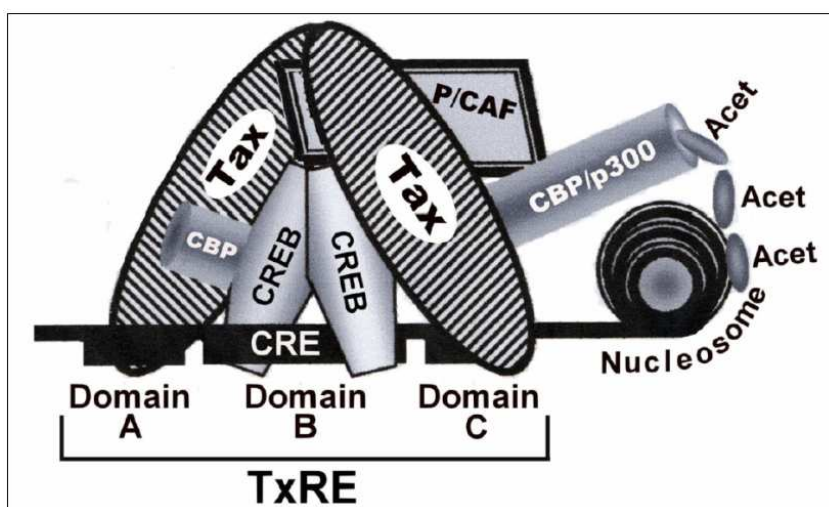


Fig. 9. Rappresentazione schematica degli elementi coinvolti nell'attivazione trascrizionale indotta da Tax dell'LTR di HTLV-1 (Azran et al., 2004).

4.11.2.2 Via di segnalazione SRF

Le linee cellulari T, infettate da HTLV-1, che esprimono Tax, mostrano un aumento dell'espressione dei geni precoci *c-Fos*, *c-Jun*, *JunB*, *JunD*, e *Fra-1*, che sono componenti dei fattori di trascrizione dimerici AP1, Egr-1 e Egr-2, fra-1, Krox-20 e Krox-24 (Fujii et al., 1991; Tsuchiya et al., 1993; Alexandre et al., 1991; Azran et al., 2004). La formazione di questi fattori di trascrizione è attivata dal fattore di risposta al siero (SRF) in seguito all'azione di svariati agenti mitogeni. Fra questi il fattore AP1, che si trova altamente espresso nelle cellule infettate da HTLV-1 (Fujii et al., 2000), è in grado di regolare l'espressione di molti geni essenziali per la proliferazione, la differenziazione e la prevenzione dell'apoptosi (Shaulian e Karim, 2002). Quindi, legandosi a SRF, Tax può attivare molti geni cellulari e indurre una cascata di effetti che avviano la cellula verso la trasformazione oncogenica (Fig. 10).

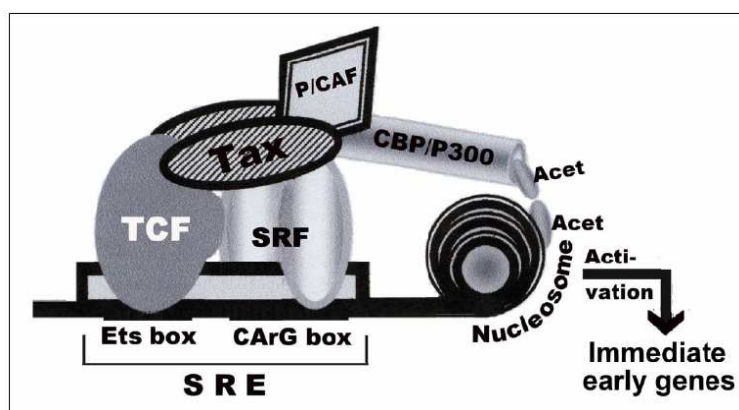


Fig 10. Rappresentazione schematica degli elementi coinvolti nell'attivazione trascrizionale indotta da Tax dei promotori dipendenti da SRF (Azran et al., 2004).

4.11.2.3 Via di segnalazione NF-κB

Una parte consistente del potenziale oncogenico di Tax è attribuibile alla sua capacità di attivare fattori di trascrizione della famiglia NF-κB (nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells), in quanto questi fattori sono in grado di regolare l'espressione di numerosi geni cellulari (Pahl, 1999) a loro volta associati a diversi processi biologici, come lo sviluppo embrionale, le risposte immuni ed infiammatorie,

la crescita cellulare, l'apoptosi e le risposte allo stress (Jeang, 2001; Ng et al., 2001; Karim e Lin, 2002; Li e Verma, 2002).

I fattori NF- κ B sono funzionalmente correlati al proto-oncogene *c-Rel* e includono le proteine p50, p52, p65 (RelA), RelB e c-Rel che agiscono in varie combinazioni di omo ed eterodimeri con specificità distinte.

Quando non sono attivati, i fattori NF- κ B sono localizzati nel citoplasma (Fig. 11) e sono strettamente legati ad inibitori chiamati I κ B, in particolare ad I κ B α e I κ B β , che sono in grado di mascherarne il segnale di localizzazione nucleare (NLS) (Beg et al., 1992).

I fattori NF- κ B possono essere attivati da una serie di stimoli, come antigeni e citochine, che scatenano due vie di segnalazione, chiamate rispettivamente canonica e non-canonica (Pahl, 1999; Karin e Lin, 2002; Li e Verma, 2002).

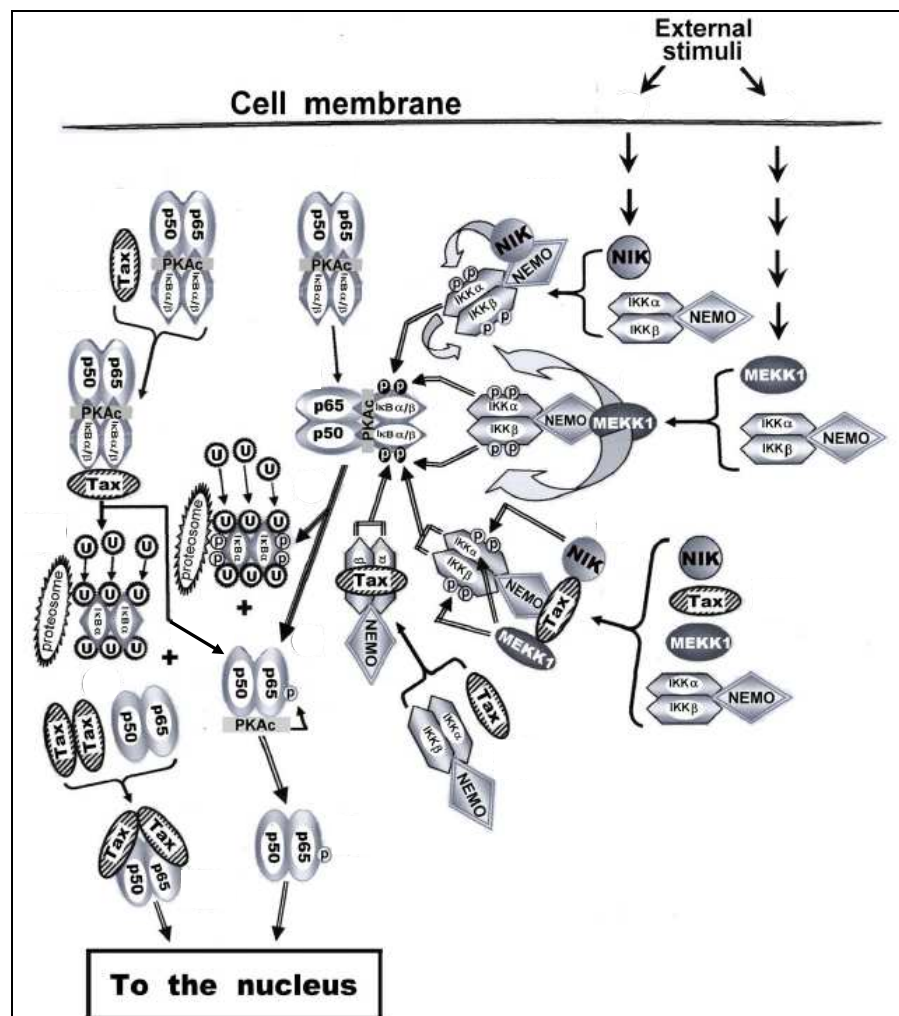


Fig. 11. Rappresentazione schematica dei fattori e delle interazioni molecolari associate al rilascio dei fattori NF- κ B dai loro inibitori I κ B nel citoplasma a seguito di stimoli esterni e dell'azione di Tax (Azran et al., 2004).

La via canonica viene attivata in risposta a stimoli infiammatori (come THF- α e IL-1), all'attivazione dei recettori delle cellule T o per esposizione a lipopolisaccaridi batterici (Pahl, 1999; Karim e Lin, 2002; Li e Verma, 2002). Il processo di attivazione prevede, inizialmente, la fosforilazione degli inibitori I κ B ad opera del complesso IKK (I κ B kinase), costituito da due subunità catalitiche (IKK α e IKK β) ed una regolatrice (IKK γ) che prende anche il nome di modulatore essenziale di NF- κ B (NEMO) (Yamamoto e Gaynor, 2004; Jin et al., 1999). Il complesso IKK viene attivato a monte dalla chinasi MAP3K (mitogen-activated protein 3 kinase) che fosforila le subunità IKK α e IKK β . La fosforilazione degli inibitori I κ B è seguita dalla loro ubiquitinazione e successiva degradazione da parte del proteasoma. Come risultato si ha il rilascio della proteina p65 che a questo punto è libera di muoversi verso il nucleo (Karin e Ben-Neriah, 2000; Perkins, 2007). I dimeri della proteina p65, una volta entrati nel nucleo, possono interagire con altri fattori di trascrizione inducendo l'attivazione di geni mitogeni.

La via di segnalazione non-canonica coinvolge l'attivazione di IKK α a seguito della sua fosforilazione operata da NIK (NF- κ B inducing kinase). IKK α fosforila a sua volta la porzione C-terminale di p100 il che comporta il riarrangiamento del complesso p100/RelB a formare p52/RelB e la sua traslocazione nel nucleo (Dejardin, 2006).

Tax-1 è in grado di stimolare sia la via di segnalazione canonica che quella non-canonica ed attivare così in maniera costitutiva i fattori NF- κ B nelle cellule infettate da HTLV-1 (Higuchi et al., 2007; Sun e Yamaoka, 2005; Xiao et al., 2001). La proteina Tax di HTLV-2 (Tax-2) non sembra invece essere in grado di agire sulla via di segnalazione non canonica (Higuchi et al., 2007).

Nella via di segnalazione canonica, Tax si associa al complesso IKK per mezzo della subunità IKK γ /NEMO (Harhaj e Sun, 1999; Jin et al., 1999) e alle chinasi a monte MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1) e TAK1 (TGF- β activating kinase 1) (Yin et al., 1998; Wu e Sun, 2007). Tax-1, quindi, è in grado di associare varie chinasi attivate al complesso IKK e promuovere la fosforilazione di IKK α e IKK β il che comporta la degradazione di I κ B α e I κ B β (Harhaj e Sun, 1999; Jin et al., 1999), anche in assenza di altri stimoli esterni. Tax-1 può anche legarsi direttamente alle subunità IKK α e IKK β e promuoverne l'attività chinasica (Chu et al., 1998).

Inoltre, Tax può legarsi direttamente agli inibitori I κ B, inducendone la degradazione e agendo così in modo indipendente rispetto al processo che porta alla loro fosforilazione operata dal complesso IKK (Hirai et al., 1994; Suzuki et al., 1995).

Tax-1 è, quindi, in grado di favorire la degradazione degli inibitori I κ B a diversi livelli, permettendo in questo modo la traslocazione dei fattori NF- κ B, indipendentemente da stimoli esterni.

L'attivazione della via di segnalazione non-canonica per mezzo di Tax-1 richiede la sua interazione con IKK γ e p100 (Higuchi et al., 2007; Xiao et al., 2001) per mezzo delle quali è in grado di dirigere IKK α verso p100, inducendo la traslocazione verso il nucleo del dimero p52/RelB.

Alcune modificazioni post-traduzionali di IKK γ , come la fosforilazione e l'ubiquitinazione, possono essere modulate da Tax-1 (Fu et al., 2003; Hong et al., 2007; Shembade et al., 2007; Shembade et al., 2008).

E' stato dimostrato che Tax-1 si localizza in strutture trascrizionalmente attive, dette "nuclear bodies", che contengono i fattori p50 e p65(RelA), la RNA polimerasi II, il RNA nascente e i fattori di splicing (Bex et al., 1997). Recentemente, è stato dimostrato che Tax-1 colocalizza con i componenti del complesso trimerico IKK (Lamsoul et al., 2005).

Tax-1 è in grado di legarsi fisicamente ai fattori p65(RelA), c-Rel, p50 e p52 (Suzuki et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Murakami et al., 1995) favorendone la dimerizzazione (Petropoulos et al., 1996) che è essenziale per il loro legame agli elementi responsivi presenti nei promotori (Suzuki et al., 1993; Suzuki et al., 1994).

4.11.3 Influenza di Tax sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'instabilità genetica

La progressione del ciclo cellulare è un processo finemente regolato, controllato da cicline associate a chinasi ciclina dipendenti (CDK). Questi complessi mediano il passaggio del ciclo cellulare verso la fase G1 e la transizione G1/S (Harper e Brooks, 2005). Tax-1 è in grado di inibire l'espressione di geni del tipo "tumor suppressor" come p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c e p19INK4d, interferendo così sulla progressione del ciclo cellulare, in particolar modo la transizione G1/S (Suzuki et al.,

1996; Low et al., 1997; Neuveut et al., 1998; Schmitt et al., 1998; Haoudi e Semmes, 2003). Questa azione è mediata attraverso diversi meccanismi che riguardano l'attivazione o la repressione trascrizionale, le modificazioni post-traduzionali e le interazioni proteina-proteina (Jeang et al., 2004; Marriott e Semmes, 2005). Nella Fig. 12 sono schematizzate le interazioni della proteina Tax-1 con i componenti del complesso ciclina D/CDK che comportano l'accelerazione della transizione G1/S (Fig. 12 A), l'attenuazione dell'attività di Chk1/2, con conseguente arresto in fase G2 e apoptosi (Fig. 12 B), l'induzione della formazione di centrosomi sovrannumerari e la perdita di attività di SAC (spindle assembly checkpoint) (Fig. 12 C) (Lemoine e Marriott, 2001; Van et al., 2001; Liang et al., 2002; Haoudi et al., 2003; Haoudi e Semmes, 2003; Boxus et al., 2008).

L'apoptosi o morte cellulare programmata (PCD) è un processo fisiologico attivo che svolge anche un ruolo fondamentale nell'eliminazione di cellule infettate da virus o cancerose. Deficienze a livello dei meccanismi di controllo dell'apoptosi si rivelano cruciali nella patogenesi del cancro e in malattie neurodegenerative ed autoimmuni. Non sorprende, quindi, che Tax-1 e Tax-2 sia coinvolta nel blocco dell'induzione dell'apoptosi. E' noto che Tax-1 svolge un ruolo fondamentale nell'immortalizzazione dei linfociti T CD4+, anche se l'espressione persistente di Tax è tossica per le cellule dato che è associata a fenomeni apoptotici in diverse linee cellulari (Yamada et al., 1994; Chlichlia et al., 1995; Nicot et al., 1997; Los et al., 1998; Nicot e Harrod, 2000).

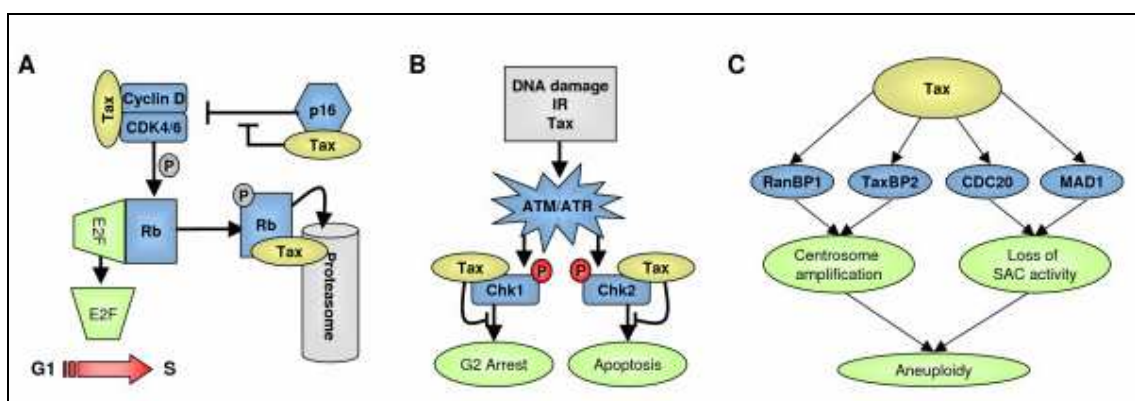


Fig. 12. Interazioni di Tax-1 con proteine associate alla progressione del ciclo cellulare (Boxus et al., 2008).

Inoltre, i linfociti trasformati da HTLV-1, sia quelli isolati dal sangue periferico di pazienti infettati che quelli immortalizzati in coltura, mostrano un ampio spettro di anomalie cromosomiche che includono delezioni, traslocazioni, riarrangiamenti, duplicazioni e aneuploidia (Chieco-Bianchi et al., 1988; Tanaka et al., 1990; Fujimoto

et al., 1999; Kao et al., 2000). Sebbene Tax abbia la capacità di interferire con molte funzioni cellulari attraverso l'attivazione trascrizionale dei geni cellulari, le interazioni proteina-proteina, e la modificazione post-traduzionale delle proteine cellulari, non è stato ancora dimostrato che induca direttamente danni al DNA (Majone e Jeang, 2000). Sembra, piuttosto, che sia in grado di inibire la riparazione dei danni del DNA introdotti da fattori esogeni, con un conseguente aumento della frequenza di mutazioni a livello cellulare (Miyake et al., 1999; Gatza e Marriott, 2006; Gatza et al., 2007). Tax inibisce la riparazione del DNA agendo a diversi livelli come, per esempio, bloccando l'espressione della DNA polimerasi β (Jeang et al., 2004) e la riducendo l'espressione della telomerasi umana hTert (Escoffier et al., 2005).

4.11.4 Localizzazione e modificazioni post-traduzionali

Come detto in precedenza, Tax svolge un ruolo cruciale nei meccanismi oncogenetici come transattivatore trascrizionale dell'espressione genica sia cellulare che virale e ciò implica che l'attività di Tax venga svolta sia nel nucleo che nel citoplasma.

Tax-1 è in grado di passare dal citoplasma al nucleo e viceversa grazie ad un determinante di localizzazione nucleare non canonico presente nei primi 60 aminoacidi della porzione N-terminale di Tax-1 e ad un segnale di esporto nucleare (NES) presente fra gli aminoacidi 189 e 202 della porzione C-terminale (Gitlin et al., 1991; Smith e Greene, 1992; Semmes e Jeang, 1992; Renjifo et al., 1995; Burton et al., 2000; Alefantis et al., 2003; Tsuji et al., 2007). Studi recenti hanno dimostrato che il processo di trasporto che coinvolge il determinante di localizzazione nucleare non richiede impiego di energia, né di proteine trasportatrici (Tsuji et al., 2007).

Nel nucleo Tax-1 si localizza principalmente in granuli di intercromatina o in regioni trascrizionalmente attive chiamate "speckle" o "nuclear bodies" (Semmes e Jeang, 1996; Lamsoul et al., 2005; Baydoun et al., 2007), mentre nel citoplasma si localizza in organelli associati con i processi cellulari di secrezione, come il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi (Nejmeddine et al., 2005; Alefantis et al., 2005a).

La localizzazione cellulare di Tax-2, invece, è ancora oggetto di studio, anche se i dati in letteratura indicano che sia localizzata principalmente nel citoplasma (Meertens et al., 2004a; Turci et al., 2006). Studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato

che esiste un determinante di localizzazione nucleare in Tax-2 che si trova nei primi 41 aa della proteina (Turci et al., 2006). I segnali di esporto nucleare sono conservati anche in Tax-2A e Tax-2B, anche se non sembrano influire sulla distribuzione cellulare (Chevalier et al., 2005).

La localizzazione intracellulare di Tax-1 è finemente regolata da modificazioni post-traduzionali come l'ubiquitinazione e la sumoilazione (Lamsoul et al., 2005). Questi due meccanismi prevedono il legame isopeptidico a dei residui di lisina presenti nella proteina target e sono implicati nella modulazione della funzione di molti fattori di trascrizione. In particolare, l'ubiquitinazione della proteina può comportare il suo trasporto verso il proteasoma, come pure la modulazione da parte della proteina ubiquitinata di importanti vie di segnalazione (Harhaj et al., 2007; Mukhopadhyay e Dasso, 2007; Mukhopadhyay e Riezman, 2007), mentre la sumoilazione media vari processi come la localizzazione nucleare, l'interazione proteina-proteina, la stabilità delle proteine, la repressione trascrizionale e la progressione del ciclo cellulare (Hay, 2005). Per quanto riguarda Tax-1, l'ubiquitinazione ne determina la ritenzione nel citoplasma, mentre la sumoilazione porta alla formazione di "nuclear bodies" contenenti la proteina e all'accumulo di molecole di Tax sumoilate nel nucleo (Lamsoul et al., 2005). Queste modificazioni svolgono un ruolo importante nell'attività trascrizionale svolta da Tax-1 che, una volta ubiquitinata, è in grado di attivare i complessi I κ B, determinando la traslocazione di RelA nel nucleo. Inoltre, le molecole di Tax-1 sumoilate favoriscono la formazione dei "nuclear bodies", che includono RelA e che sono direttamente coinvolti nell'attivazione dell'espressione genica mediata da Tax-1 (Lamsoul et al., 2005). Recentemente, il nostro gruppo di lavoro ha contribuito allo studio di queste modificazioni dimostrando che anche Tax-2B risulta sia ubiquitinata che sumoilata e che forma anch'essa strutture simili ai "nuclear bodies" (Turci et al., 2009).

Un'altra modificazione post-traduzionale che svolge un ruolo fondamentale sull'attività di Tax-1 e di altri fattori di trascrizione è l'acetilazione che influisce sulla loro affinità di legame al DNA e sulla loro capacità di interagire con coattivatori e repressori (Glozak et al., 2005).

4.11.5 Secrezione

Tax-1 viene secreta nel supernatante dei linfociti infettati da HTLV-1 ottenuti da pazienti affetti da TSP/HAM e messi in coltura (Alefantis et al., 2005a; Marriott et al., 1991; Jain et al., 2007).

La presenza di Tax a livello extracellulare causa l'induzione di TNF- α nelle cellule neuronali umane in coltura (Cowan et al., 1997) ed è stato dimostrato che è in grado di indurre la produzione di TNF- α , IL-1 β e IL-6 nelle cellule microgliali umane e nei macrofagi del sangue periferico (Dhib-Jalbut et al., 1994). L'induzione di questi fattori a livello cellulare può facilitare il mantenimento di uno stato di infiammazione e contribuire al processo di demielinazione osservato nel corso della progressione della TSP/HAM (Cowan et al., 1997). Questa patologia, come detto in precedenza, è caratterizzata da una risposta immunitaria forte e persistente legata alla presenza di linfociti T citotossici specifici per Tax sia nel sangue periferico che nel fluido cerebrospinale (Kubota et al., 2000; Kubota et al., 2002; Jacobson et al., 1988a; Jacobson et al., 1990; Greten et al., 1998). Questo suggerisce che Tax sia disponibile per essere riconosciuta da parte delle cellule presentanti l'antigene. E' stato, infatti, dimostrato che la presenza di Tax a livello extracellulare può indurre l'espressione di diversi geni coinvolti nell'attivazione e nella maturazione delle cellule dendritiche (Ahuja et al., 2006). Inoltre, è stato dimostrato che Tax extracellulare può essere inglobata da parte delle cellule presentanti l'antigene e presentata alle cellule T (Grant et al., 2002).

Il meccanismo di secrezione di Tax non è stato ancora completamente chiarito anche se è stato dimostrato che può essere rilasciata dalle cellule trasformate da HTLV-1 attraverso un meccanismo diverso da quello della morte cellulare (Lindholm et al., 1990). Sebbene Tax non contenga alcuna sequenza tipica delle proteine secrete, mostra una ridotta capacità secretoria se deleta di alcuni aminoacidi alla porzione C-terminale (Alefantis et al., 2005a). E' stato, inoltre, dimostrato che Tax interagisce con molte proteine coinvolte nella modulazione della via secretoria cellulare, come calreticulina, RanBP2, NTF, p97, β COP, COPII, SNAP23, SCAMP1 e SCAMP2 (Alefantis et al., 2005a; Alefantis et al., 2005b; Alefantis et al., 2007). Studi recenti condotti con l'impiego di mutanti nei segnali putativi di secrezione DHE e YTNI, hanno permesso di

osservare una localizzazione subcellulare aberrante di Tax e un'alterazione della quantità di proteina secreta (Jain et al., 2007).

5. SCOPO DELLA RICERCA

Nel periodo di svolgimento del dottorato sono stati affrontati due diversi progetti di ricerca. Il primo ha riguardato lo studio della proteina transattivatrice Tax del retrovirus umano HTLV (Human T-cell Leukemia Virus). Allo scopo di evidenziare possibili differenze funzionali, è stata compiuta un'analisi comparativa delle proteine Tax di HTLV-1 e HTLV-2B, rispettivamente Tax-1 e Tax-2B, ritenute responsabili della differente patogenicità dei due virus (Lewis et al., 2002; Araujo e Hall, 2004; Matsuoka e Jeang, 2007). Lo studio ha riguardato inizialmente la messa a punto di un sistema di "tagging" per l'identificazione delle due proteine che non interferisse con la loro attività trascrizionale e che permettesse di utilizzare un solo anticorpo per il loro riconoscimento. Utilizzando questo sistema è stato possibile analizzare le modificazioni post-traduzionali della proteina Tax-2B, delle quali non esistevano ancora informazioni in letteratura, e di paragonarle con quelle riscontrate per Tax-1. Un altro problema che è stato affrontato ha riguardato la localizzazione intracellulare delle due proteine, argomento ancora molto dibattuto in letteratura (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004a; Semmes et al., 1996; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2006).

Il secondo progetto di ricerca è stato indirizzato allo studio dei livelli di espressione dei trascritti di HTLV-2. Si ritiene infatti che l'analisi del profilo di espressione virale possa contribuire a comprendere il ruolo funzionale di specifici geni virali nei processi di infezione e di trasformazione cellulare (Feuer e Green, 2005; Kashanchi e Brady, 2005; Nicot et al., 2005; Li et al., 2009). A questo scopo il lavoro sperimentale è stato focalizzato sulla messa a punto di un sistema efficace e riproducibile per la rilevazione e la quantificazione dei sette diversi trascritti di HTLV-2. Al fine di mettere in luce possibili differenze, è stata analizzata l'espressione virale in diversi sistemi cellulari e a diversi stadi di infezione del virus.

6. MATERIALI E METODI

6.1 COLTURE CELLULARI

6.1.1 LINEE CELLULARI

Le cellule 293T sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 10% di FCS (Fetal Calf Serum). Al terreno sono stati aggiunti L-Glutammina (2mM), Penicillina-Streptomicina (1%) e Sodio Piruvato (1 mM).

Le linee cellulari C344 Mo, Mo-T (stabilmente infettate da HTLV-2A) e BJAB-Gu (stabilmente infettata da HTLV-2B) sono state coltivate in terreno RPMI 1640 con 10% di FCS (Fetal Calf Serum). Al terreno sono stati aggiunti L-Glutammina (2mM) e Penicillina-Streptomicina (1%). Queste cellule sono state analizzate inizialmente in fase esponenziale di crescita; successivamente, le linee BJAB-Gu e C344 Mo sono state piastrate ad un decimo della loro concentrazione ottimale, prelevate a tempi diversi ed analizzate con la metodica Real-Time RT-PCR. In particolare, le cellule BJAB-Gu sono state analizzate ogni 24 ore, mentre le cellule C344 Mo a 0, 24, 48, 96, 144, 192 e 256 ore. Nella Tab. 2 sono riassunte schematicamente le concentrazioni di cellule attese ai tempi in cui sono state prelevate, calcolate sulla base del fatto che la linea cellulare BJAB-Gu ha un tempo di duplicazione di 24 ore, mentre la linea C344 Mo di 48 ore.

ORE	BJAB-Gu (n° cellule attese)	C344 Mo (n° cellule attese)
0	2,5E+04	2,5E+04
24	5,0E+04	2,5E+04
48	1,0E+05	5,0E+04
72	2,0E+05	-
96	4,0E+05	1,0E+05
120	8,0E+05	-
144	-	2,0E+05
192	-	4,0E+05
256	-	8,0E+05

Tab. 2 Stima del numero di cellule attese al momento del campionamento per le linee cellulari BJAB-Gu (tempo di duplicazione di 24 ore) e C344 Mo (tempo di duplicazione di 48 ore).

6.1.2 PBMC

I PBMC criopreservati ottenuti da un paziente italiano mono-infettato da HTLV-2B sono stati scongelati e risospesi in 40 ml di terreno RPMI completo al quale sono stati aggiunti gli antibiotici Penicillina-Streptomicina (1%). Una volta risospesi, sono stati contati mediante la camera Neubauer. Successivamente, i PBMC sono stati centrifugati a 1200g per 7 minuti e il pellet è stato risospeso in 10 ml dello stesso terreno usato in precedenza. La coltura ottenuta è stata aliquotata in 3 pozzetti da 35 mm ad una concentrazione di $3,5 \times 10^6$ cellule per pozzetto. Dopo 4, 14 e 20 ore i PBMC sono stati prelevati, centrifugati a 1200g per 5 minuti e risospesi in 800 µl di TRIzol®.

6.2 TRASFEZIONI

Le cellule 293T sono state seminate e lasciate crescere fino ad una confluenza dell'80% su vetrino copri-oggetto o in celle Labtek (Nunc) per 24 ore prima della trasfezione. La trasfezione è stata effettuata con l'impiego del reagente Polyfect (Qiagen), in accordo con il protocollo suggerito dalla ditta, utilizzando 0,5 µg di plasmide per pozzetto.

6.3 ANTICORPI

Come anticorpi primari sono stati utilizzati:

- policlonale di coniglio anti-HA (Y-11) (Santa Cruz Biotechnology);
- policlonale di coniglio anti-RelA (C-20) (Santa Cruz Biotechnology);
- monoclonale anti-Flag (M2) (Sigma);
- monoclonale anti-6His (Penta.His) (Qiagen);
- anticorpo monoclonale anti-Tax-1 proveniente dall'ibridoma 168-A51 (AIDS Research and Reagent Program, National Institute of Health);
- siero policlonale di coniglio anti-Tax-2 gentilmente fornito da R. Mahieux (Meertens et al., 2004a; Meertens et al., 2004b).

Come anticorpi secondari sono stati utilizzati:

- anti-immunoglobulina G (IgG) di topo coniugato ad Alexa Fluor 488 (Invitrogen);
- anti-immunoglobulina G (IgG) di coniglio coniugato ad Alexa Fluor 594 (Invitrogen).

6.4 IMMUNOCITOCHIMICA E MICROSCOPIA CONFOCALE

Le cellule 293T, a 24 ore dalla trasfezione, sono state fissate in metanolo 100% a -20 °C per 6 minuti, lavate per 3 volte con PBS e incubate a temperatura ambiente in una soluzione A (PBS 0,25% e 0.5% gelatina). Successivamente, le cellule sono state incubate a 4°C per 12 ore nella soluzione A alla quale sono stati aggiunti gli anticorpi primari seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Trascorso questo periodo, i vetrini sono stati lavati 3 volte per 10 minuti con PBS-0.5% gelatina e, successivamente, incubati a temperatura ambiente con la soluzione A alla quale sono stati aggiunti gli anticorpi secondari seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Infine, dopo essere stati lavati 3 volte con PBS-0.5% gelatina, i vetrini sono stati montati con una soluzione di glicerolo al 90%.

I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale Zeiss LSM510 utilizzando un obiettivo 63X e sorgenti luminose a 488 e 543 nm.

6.5 NI-NTA PULLDOWN E ANALISI WESTERN BLOT

Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lavate per 3 volte con PBS e raccolte dopo breve incubazione in 10 mM EDTA-PBS. Successivamente, le cellule sono state lisate in una soluzione PBS-8M UREA a cui sono stati aggiunti gli inibitori di proteasi “complete” (Roche).

Gli esperimenti di Ni-NTA pulldown sono stati eseguiti sulle cellule lisate in accordo con i protocolli precedentemente pubblicati (Lamsoul et al., 2005; Chiari et al., 2004).

Per quanto riguarda l’analisi Western Blot, gli esperimenti sono stati condotti nel seguente modo. Le cellule sono state lisate con un buffer non denaturante (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA 150 mM NaCl e 1% Triton X100), aggiungendo inibitori di

proteasi “complete” (Roche), sottoposte a sonicazione per 20 secondi e, successivamente, centrifugate a 13000g per 15 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto è stato incubato a 70°C per 10 minuti in GLB 1X (Gel Loading Buffer, Invitrogen). Il materiale ottenuto è stato sottoposto a corsa elettroforetica su un gel Bis-Tris NuPage 4-12% (Invitrogen). Come standard proteici sono stati utilizzati IGG attivati Magic Mark XP western standard (Invitrogen).

Per mezzo del “Semy Dry Transblot System” (Biorad), seguendo il protocollo suggerito dalla ditta, le proteine sono state trasferite dal gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL Nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia Biotech) che è stata, poi, incubata per 1 ora a 37 °C in una soluzione contenente PBS e latte scremato al 5% e, successivamente, per 2 ore in una soluzione (PBS e latte scremato al 0,5-3%) contenente l’anticorpo primario e per 45 minuti in una soluzione (PBS e latte scremato al 0,5-3%) contenente l’anticorpo secondario, in accordo con le condizioni suggeriti dalle ditte produttrici. Alla fine di ciascuna incubazione sono stati eseguiti 3 lavaggi con una soluzione 0.05%. Tween-TBS.

Le bande contenenti le proteine sono state visualizzate mediante i substrati Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) o Chemi-luminescent Peroxidase Substrate (Sigma-Aldrich).

La rilevazione e la quantificazione dei segnali chemioluminescenti è stata effettuata con i programmi informatici Chemi-Smart 5000 e Bio-1D (Vilber Lourmat) o Autochemi e Gel Pro Analyzer (UVP BioImaging Systems).

6.6 SAGGI DI TRANSATTIVAZIONE

La transattivazione mediata dalle proteine Tax-1 e Tax-2B nei confronti dei promotori di HTLV-1, HTLV-2 e HIV-1 è stata saggiata mediante il saggio di luciferasi. Le cellule 293T sono state seminate in 12 pozzetti 24 ore prima della trasfezione ad una densità di $1,25 \times 10^5$ cellule per pozzetto. Come controllo negativo per il saggio di luciferasi è stato utilizzato il vettore pGL3 privo di promotore. Al fine di normalizzare i risultati in ciascun pozzetto sono stati co-trasfettati 50 ng del plasmide phRG-TK (Promega) che contiene il gene reporter “Renilla firefly” (Ren). Anche in questo caso la trasfezione è stata condotta mediante il reagente Polifect (Qiagen) utilizzando 400 ng di ciascun vettore di espressione contenente Tax-1 e Tax-2B e 500

ng dei plasmidi reporter luciferasi (Luc) con i promotori HTLV-1-LTR-, HTLV-2-LTR, per quanto riguarda la via di segnalazione ATF/CREB o con il promotore HIV-1-LTR, per quanto riguarda la via di segnalazione NF- κ B.

A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte, lisate ed analizzate con il sistema “Dual Luciferase” (Promega) ed il segnale Luc/Ren è stato rilevato mediante il luminometro TD-20/20 (Turner Designs).

6.7 CLONAGGI MOLECOLARI E SEQUENZIAMENTI

6.7.1 COSTRUZIONE DI VETTORI D'ESPRESSIONE

Il plasmide di espressione contenente Tax-2B, pJFE-Tax-2, è stato ottenuto dal clonaggio dei frammenti ottenuti dall'amplificazione per mezzo di PCR di una porzione della regione pX del DNA provirale di un soggetto italiano infettato da HTLV-2 (Turci et al., 2006) in corrispondenza del sito di restrizione EcoRI nel vettore d'espressione pJFE14 (Takebe et al., 1988).

I plasmidi Tax-1F e Tax-2F sono stati ottenuti con l'inserzione della sequenza codificante per l'epitopo Flag, seguita da 6 Istidine, al nucleotide in posizione 1011 delle sequenze codificanti per Tax-1 e Tax-2B. In questo modo è stata ottenuta l'inserzione in fase di 14 aminoacidi alla posizione aminoacidica 337 di entrambe le proteine. I costrutti Tax-1F e Tax-2F sono stati clonati nel vettore d'espressione pcDNA6.2/N (Invitrogen) utilizzando il sito di restrizione EcoRI.

I vettori che esprimono l'ubiquitina e SUMO-1 legata all'epitopo dell'emoagglutinina dell'influenza (HA) in posizione N-terminale e i plasmidi reporter HTLV-1-LTR-luciferase e HIV-1-LTR-luciferase sono stati descritti in passato (Lamsoul et al., 2005). Il plasmide HTLV-2-LTR-luciferase è stato gentilmente fornito da R. Mahieux.

6.7.2 CLONAGGIO DI PORZIONI DEI TRASCRITTI DI HTLV-2

Gli amplificati ottenuti in RealTime PCR sono stati purificati da gel mediante il kit commerciale “Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Questi frammenti sono stati riamplicati utilizzando la polimerasi “Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase” (Finnzymes), che possiede attività esonucleasica 3’-5’. Le concentrazioni utilizzate nella miscela di reazione di PCR sono riportate nella Tab. 3, mentre il protocollo termico utilizzato è riassunto schematicamente nella Tab. 4.

MISCELA DI REAZIONE	
REAGENTI	CONCENTRAZIONE FINALE
DNA stampo	circa 50 ng
Buffer Phusion® HF 5X	1X
dNTP 10 mM ciascuno	200 µM di ciascuno
Primer senso ed antisenso	0,5 µM di ciascuno
Phusion® Hot Start DNA Polimerasi	0,4 U
H ₂ O	fino a 20 µL

Tab. 3. Concentrazioni dei reagenti utilizzati per la reazione di PCR.

DENATURAZIONE INIZIALE	CICLI DI AMPLIFICAZIONE (X30)			ESTENSIONE FINALE
	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE	
98°C x 30 secondi	98°C x 9 secondi	56/61°C x 30 secondi	72°C x 7/10 secondi	72°C x 7 minuti

Tab. 4. Protocolli termici utilizzati per la reazione di PCR. Le temperature di annealing e la durata dell'estensione sono stati variati in funzione, rispettivamente, della T° di melting dei primer e della lunghezza del frammento da amplificare.

Il prodotto di amplificazione è stato risolto e nuovamente eluito da gel mediante il kit commerciale “Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

Per i clonaggi è stato utilizzato il plasmide pBluescript SK +/- (Stratagene) di cui sono stati digeriti circa 1000 ng con 10 unità dell'enzima di restrizione EcoRV (New England Biolabs), in un volume di 20 µL di reazione a 37°C per 2 ore. La digestione è stata caricata su gel e successivamente eluita mediante il kit commerciale

“Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare), come per l’inserito.

La ricircolarizzazione del DNA plasmidico digerito è stata minimizzata mediante una reazione di defosforilazione con una fosfatasi alcalina. È stato impiegato l’enzima SAP (*Schrimp Alkaline Phosphatase*, New England Biolabs), alla concentrazione di 1U per µg di plasmide da defosforilare. La reazione è stata condotta per 15 minuti a 37°C, condizione in cui l’enzima è operativo, e per altri 15 minuti a 65 °C, condizione in cui l’enzima viene disattivato. All’inserito, invece, è stato aggiunto un gruppo fosfato per mezzo della “T4 polynucleotide Kinase” (New England Biolabs) utilizzando 10 unità di enzima per circa 300 pmol di estremità 5’ di frammento. La reazione è stata condotta per 30 minuti a 37°C, condizione in cui l’enzima è operativo, e per altri 20 minuti a 65 °C, condizione in cui l’enzima viene disattivato.

La ligazione del frammento e del vettore plasmidico è stata effettuata mediante l’impiego dell’enzima “T4-DNA Ligase” (New England Biolabs). La quantità di DNA, sia del vettore plasmidico che dell’inserito, da utilizzare per la reazione è stata determinata previa quantificazione per mezzo dello strumento Nanodrop. Sono stati utilizzati rapporti stechiometrici tra vettore ed inserto pari a 1:3 e 1:6. La reazione è stata condotta, in un volume totale di 10 µL a 16 °C per circa 16 ore.

Per la trasformazione sono stati utilizzati 50 µL di cellule chimicamente competenti di *E. coli* DH5α alle quali sono stati aggiunti 5 µL di ligazione. La reazione è proceduta in ghiaccio per 30 minuti al termine dei quali è stata portata a 42°C per 30 secondi e nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Successivamente, è stato aggiunto 1 mL di Terreno ricco LB (estratto pancreatico di caseina, estratto di lievito, NaCl) ed il tutto è stato incubato per 1 ora a 37°C in agitazione. Le cellule sono, quindi, state seminate su piastra contenente LB agarizzato addizionato con l’antibiotico ampicillina (100 µg/mL) e X-GAL (32 µg/mL). Il tutto è stato incubato per almeno 16 ore a 37 °C. Le cellule di *E. coli* trasformate sono state individuate mediante selezione del colore: esse appaiono, infatti, di colore bianco al contrario di quelle non trasformate che appaiono di colore blu a causa dell’interruzione del gene per la β-galattosidasi presente nella regione polylinker del plasmide pBlueScript SK +/- . Alcune colonie bianche sono state sottoposte alla verifica dell’effettiva presenza del frammento clonato mediante PCR da colonia utilizzando i primers T3 (5’-AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA-3’) e T7 (5’-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3’) la cui sequenza complementare è presente all’esterno del polilinker. Da alcune colonie positive è stato estratto il plasmide

utilizzando il kit commerciale “Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare), secondo il protocollo indicato dalla ditta distributrice. Tale plasmide è stato sequenziato mediante il primer T7 presso il centro BMR di Padova che utilizza un sequenziatore Roche (modello Genome Sequencer FLX).

6.8 ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

Per l'estrazione del RNA è stato utilizzato il reagente TRIzol® (Invitrogen) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta.

Il RNA estratto è stato quantificato mediante l'impiego dello strumento Nanodrop che, oltre a determinare la quantità e la qualità del campione analizzato, ne fornisce anche lo spettro di assorbimento.

Inoltre, è stata verificata anche l'integrità del RNA estratto con lo strumento Bioanalyzer 2100 (Agilent) che utilizza un chip con un set di microcapillari all'interno dei quali viene colato un gel. Al termine dell'analisi lo strumento restituisce un interferogramma ed un profilo elettroforetico del campione.

Per l'estrazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il kit commerciale “Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta.

6.9 RETROTRASCRIZIONE DEL RNA

Il RNA estratto è stato retrotrascritto in cDNA mediante la retrotrascrittasi (RT) “AMV Reverse Transcriptase” (Finnzyme) e mediante il kit commerciale “QuantiTect Reverse Transcription” (Qiagen) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta. Nel primo caso, prima della retrotrascrizione, il RNA è stato sottoposto ad un trattamento con DNasi al fine di eliminare il DNA genomico potenzialmente presente nella miscela di RNA estratto. A questo scopo sono state utilizzate diverse quantità (1 Unità e 1,5 Unità) dell'enzima “Deoxyribonuclease I, Amplification Grade” (Invitrogen). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 15 minuti, condizione in cui l'enzima è operativo, e per altri 10 minuti a 65°C, condizione in cui l'enzima viene disattivato.

Nel kit commerciale della ditta Qiagen, è previsto un passaggio per l'eliminazione del DNA genomico potenzialmente presente nella miscela di RNA estratto, e non è quindi necessario trattare preventivamente con DNasi.

Sono stati generati anche dei controlli negativi della retrotrascrizione allestendo delle reazioni prive della retrotrascrittasi. A partire dai cDNA ottenuti da questa reazione non deve avvenire alcuna amplificazione, che sarebbe altrimenti da attribuirsi alla presenza di DNA genomico nella miscela di RNA estratto.

6.10 REAL TIME PCR

Questo lavoro è stato incentrato sulla quantificazione dei livelli di espressione dei diversi trascritti di HTLV-2. A questo scopo è stata utilizzata la metodica TaqMan Real-Time RT-PCR che si avvale dell'utilizzo di primer e di sonde specifici per l'amplificazione dei frammenti d'interesse. In particolare, ogni sonda Taqman è marcata alle due estremità con due diversi fluorofori chiamati Reporter (R) e Quencher (Q). Nel nostro caso sono stati utilizzati i fluorofori VIC e FAM come Quencher e TAMRA come Reporter. Quando questi due fluorofori si trovano vicini Q è in grado di spegnere l'effetto di R, assorbendone i fotoni. Ad ogni ciclo di reazione di PCR, il DNA stampo viene denaturato e viene successivamente permesso l'appaiamento ad esso da parte di sonda e primer. In seguito, come in una normale PCR, avviene la reazione di polimerizzazione durante la quale la polimerasi, grazie alla sua attività esonucleasica 5'-3', è in grado di degradare la sonda che incontra appaiata al frammento stampo. A questo punto R e Q vengono liberati nella miscela di reazione e si trovano quindi distanti l'uno dall'altro con una conseguente emissione di fluorescenza da parte di R che viene rilevata dallo strumento. L'emissione di fluorescenza misurata durante la fase di estensione è proporzionale alle molecole prodotte.

La strategia di disegno dei primer e delle sonde da utilizzare in Real Time è riassunta schematicamente nella Fig. 13 in cui le sonde sono rappresentate dalle linee rosse, mentre i primer dalle frecce verdi. I primer sono stati disegnati, ove possibile e necessario, a cavallo delle regioni di splicing in modo da amplificare tutti i sette diversi trascritti e discriminarli senza errori.

Per la normalizzazione delle reazioni è stato utilizzato come standard interno il 18SrRNA ed, in particolare, il kit commerciale "Eukaryotic 18S rRNA Endogenous

Control” (Applied Biosystem) che contiene una miscela di primer e sonde disegnati su una regione non specificata.

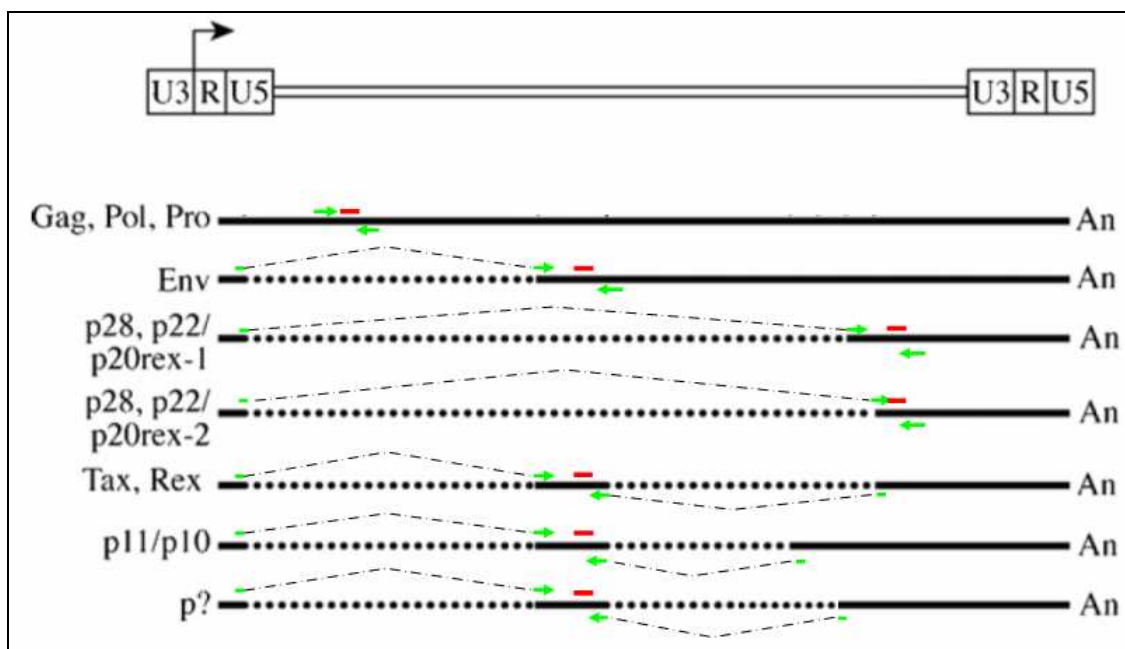


Fig. 13. Schema riassuntivo della strategia utilizzata per disegnare i primer e le sonde da utilizzare in Taqman Real Time PCR per l'amplificazione dei sette diversi trascritti di HTLV-2. Le frecce verdi e le linee rosse indicano, rispettivamente, le zone in cui sono stati disegnati i primer e le sonde. Le linee tratteggiate rappresentano le regioni corrispondenti agli introni. I numeri corrispondono ai nucleotidi nella sequenza dell'isolato MO (Gene Bank accession number M10060,1)

Per il trascritto per le proteine Tax/Rex sono state utilizzate due diverse strategie di amplificazione che sono riassunte schematicamente nelle Fig. 14.

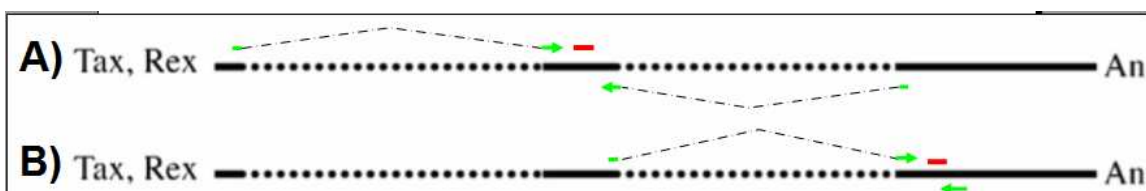


Fig. 14. Confronto fra l'antecedente ed il nuovo schema di primer e sonde per il trascritto per le proteine Tax/Rex. Le frecce verdi e le linee rosse indicano, rispettivamente, le zone in cui sono stati disegnati i primer e le sonde.

Le sequenze dei primer e delle sonde utilizzati sono riassunti nella Tab. 5.

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA
GP2-S	¹⁹⁰⁴ GCCTACCCAAGCGCTACTT ¹⁹²²
TR2-S	¹²³ TGCTCCTCCCAAG ^{135^4730} GAAGC ⁴⁷³⁴
TAX2bFW	⁴⁸⁶³ ACCATGG ^{4869^6900} CCCATTCCCAAGG ⁶⁹¹²
P28-ITC-S	¹²⁴ GCTCCTCCCAAG ^{135^6630} GCGCTC ⁶⁶³⁴
P28-2-S	¹²³ TGCTCCTCCCAAG ^{135^6900} CCCAT ⁶⁹⁰⁴
GP2-AS	¹⁹⁷⁰ CCCGGGCACGAGTGTCT ¹⁹⁵⁴
ENV2-AS	⁴⁸⁸⁸ AGTAGGAAGAAAACATTACCCATGGT ⁴⁸⁶³
TR2-AS	⁶⁹¹⁵ AATCCTGGGAAATGGG ^{6900^4869} CCAT ⁴⁸⁶⁶
P28-AS	⁶⁹⁸⁴ GGACACCAATCGGCCTGTAC ⁶⁹⁶⁵
P10-AS	⁶⁵⁰⁶ GGGAAAAGAAGGTC ^{6493^4869} CCATG ⁴⁸⁶⁵
?-AS	⁶⁶⁴³ GCAGAAAGGAGCGC ^{6630^4869} CCAT ⁴⁸⁶⁶
SONDE	
TMP-6	FAM ⁴⁸⁰⁰ AAGCTGCATGCCCAAGACCAGACGCC ⁴⁸²⁵ TAMRA
TMP-7	FAM ⁶⁹³⁹ ACCCCGTCTACGTGTTTGGCTATTG ⁷³⁶³ TAMRA
TMP-8	FAM ¹⁹²⁵ CACAGGAGCCGACCTTACGGTTATACCC ¹⁹⁵² TAMRA

Tab. 5. Sequenze nucleotidiche dei primer e delle sonde utilizzate in TaqMan Real-Time PCR.

Per l'analisi Real-Time PCR è stato utilizzato lo strumento "Mastercycler® ep realplex" (Eppendorf) che utilizza un proprio programma informatico per l'analisi dei dati.

Nel corso della messa a punto dell'analisi Real-Time sono stati saggiati tre diverse tipi di mix di reazione: RealMasterMix Probe (5PRIME), TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e TaqMan ® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems).

Per l'identificazione della massa di DNA plasmidico utilizzato per la generazione delle curve standard è stata utilizzata la seguente formula:

$$m = (n)[(1 \text{ mole}/6,023 \times 10^{23} \text{ molecole (bp)}](660 \text{ g/mole})$$

dove "m" corrisponde alla massa, "n" alla dimensione del genoma in bp, $6,023 \times 10^{23}$ è il numero di Avogadro e 660g/mole corrisponde al peso molecolare delle molecole di DNA a doppio filamento.

Per ottimizzare le condizioni di reazione di Real Time PCR sono state generate delle curve standard mediante l'utilizzo di diluizioni seriali di plasmidi contenenti le

porzioni da amplificare (vedi paragrafo “Clonaggio di porzioni dei trascritti di HTLV-2”).

Inoltre, per determinare le quantità ottimali di primer e sonde per l'amplificazione di ciascun trascritto, sono state allestite delle reazioni di PCR seguendo delle matrici di concentrazione (Tab. 6).

PRIMER ANTISENSO (nM)	PRIMER SENSO (nM)		
	300	500	700
300	300/300	500/300	700/300
500	300/500	500/500	700/500
700	300/700	500/700	700/700

Tab. 6. Matrice di concentrazione di primer.

Le reazioni di Real-Time PCR sono state condotte con due diversi protocolli termici che sono riassunti nella Tab. 7.

DENATURAZIONE INIZIALE	CICLI DI AMPLIFICAZIONE (X45)		
	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
94°C x 2 minuti	94°C x 15 secondi	60°C x 1 minuto	
94°C x 2 minuti	94°C x 15 secondi	58°C x 30 secondi	72°C x 30 secondi

Tab. 7. Protocolli termici utilizzati per la reazione di Real-Time PCR.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato ed è stata calcolata la media matematica dei valori ottenuti per le tre amplificazioni. Il numero di copie rilevato per i diversi trascritti è stato normalizzato a quello del trascritto del 18SrRNA e moltiplicato per un fattore 10^7 . Per quanto riguarda l'analisi della cinetica di espressione delle linee cellulari BJAB-Gu e C344 Mo e dei PBMC, i dati sono stati espressi come “fold variation” e, quindi, i valori ottenuti per ciascun trascritto sono stati divisi per il massimo valore rilevato.

Per l'analisi statistica e la rappresentazione grafica è stato utilizzato il programma Excel (Microsoft).

7. RISULTATI

7.1 LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DELLA PROTEINA TAX DI HTLV E SUE MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI

Il lavoro svolto in questi tre anni di dottorato è stato suddiviso in due linee di ricerca.

In un primo tempo sono state affrontate le problematiche della localizzazione intracellulare della proteina Tax e delle sue modificazioni post-traduzionali. Questo studio ha permesso di ottenere risultati innovativi che sono stati recentemente pubblicati su *Virology* (Turci et al., 2009). Il lavoro è stato focalizzato, in particolare, sul confronto fra la proteina Tax del sottotipo HTLV-2B (Tax-2B) e la proteina Tax-1 di HTLV-1. Queste proteine, pur presentando una omologia di sequenza aminoacidica del 85%, sono generalmente ritenute responsabili delle diverse proprietà patogeniche dei due virus.

7.1.1 SISTEMI PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE TAX-1 E TAX-2B

Le proteine Tax-2B e Tax-1 non sono facilmente comparabili *in vitro* dato che non è ancora attualmente disponibile un singolo anticorpo in grado di riconoscerle entrambe. A questo fine è stato sviluppato un sistema per la loro identificazione che ne preservasse l'attività trascrizionale. Inizialmente, si è pensato di legare alle loro estremità terminali delle proteine tag, come, ad esempio, la GFP (Green Fluorescent Protein), ma i risultati ottenuti hanno mostrato che questa modificazione poteva interferire con la localizzazione cellulare e con l'efficienza trascrizionale di Tax. Si è pensato, quindi, di inserire un tag interno (Flag-6His, abbreviato come "F"), in corrispondenza dell'aminoacido 337 di Tax-1 e in posizione equivalente per la proteina Tax-2B, in modo da non modificare lo schema di lettura delle proteine, ottenendo delle proteine di fusione che sono state denominate Tax-1F e Tax-2F. Questo sistema è stato utilizzato per permettere, da un lato, il riconoscimento di entrambe le proteine grazie ad un singolo anticorpo anti-Flag e, dall'altro, la loro purificazione sfruttando l'affinità delle 6 istidine per la resina Ni-NTA.

I lisati totali delle cellule 293T trasfettate con i vettori di espressione contenenti Tax-1F e Tax-2F sono stati analizzati mediante Western blot, utilizzando l'anticorpo anti-Flag che ha permesso di ottenere la rilevazione di un'unica banda sia per Tax-1F che per Tax-2F.

7.1.2 ANALISI DELLA CAPACITÀ TRANSATTIVANTE DELLE PREOTEINE TAX-1 E TAX-2

Sono state confrontate le proteine Tax-1 e Tax-2 prive di tag con Tax-1F e Tax-2F per la capacità di attivare l'espressione genica attraverso le vie ATF/CREB e NF- κ B (Fig. 15).

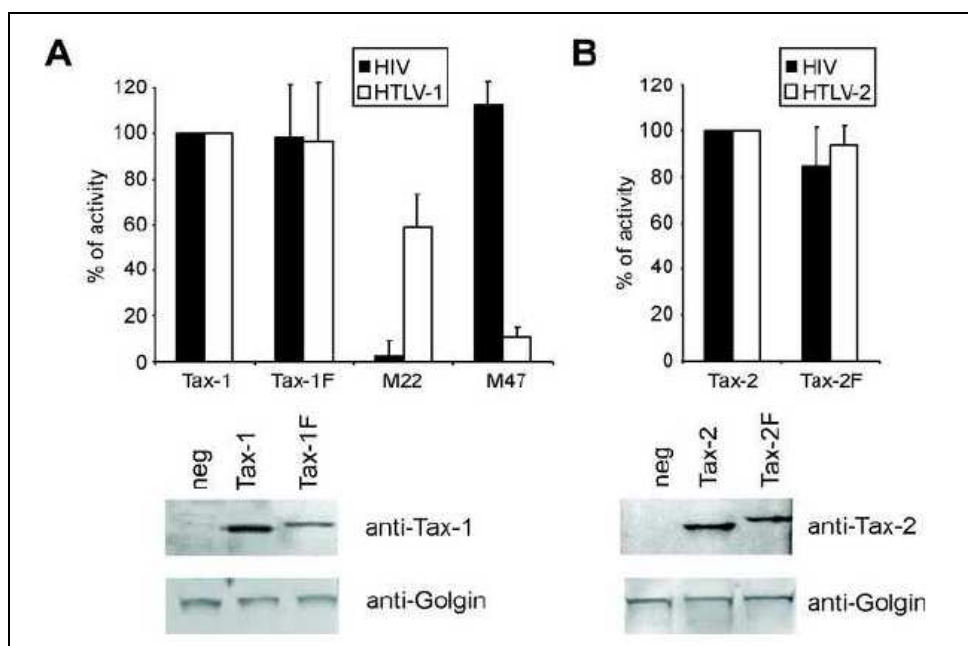


Fig. 15. Risultati degli esperimenti di transattivazione delle vie ATF/CREB e NF- κ B condotti con Tax-1F e la proteina Tax-1 priva di tag (A), e con Tax-2F e la proteina Tax-2 priva di tag (B). Nella figura è riportata anche l'attività trascrizionale dei mutanti di Tax-1 M22 e M47 utilizzati come controlli interni negativi dell'attivazione rispettivamente delle vie NF- κ B e ATF/CREB. I dati relativi ai saggi di transattivazione delle proteine Tax-1F e Tax-2F sono espressi come percentuale delle rispettive proteine prive di tag e corretti per la quantità di ciascuna proteina stimata in Western Blot.

In particolare, nella Figura 15A sono riportati i risultati ottenuti dalla cotrasfezione di Tax-1 e Tax-1F con i costrutti contenenti le LTR di HTLV-1 e HIV-1, mentre nella Figura 15B quelli ottenuti dalla cotrasfezione di Tax-2 e Tax-2F con i costrutti contenenti le LTR di HTLV-2 e HIV-1. Come è possibile osservare, i risultati

non hanno mostrato valori significativamente differenti fra le proteine con tag e quelle prive e ciò sta ad indicare che le modificazioni apportate alle proteine Tax-1F e Tax-2F non influiscono sull'attività trascrizionale delle stesse.

7.1.3 MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI DI TAX-2B

Sono state analizzate le modificazioni post-traduzionali della proteina Tax-2B e, in particolare, l'attenzione è stata concentrata sull'ubiquitinazione e la sumoilazione che, nel caso di Tax-1, influiscono sulla localizzazione intracellulare e sull'attività trascrizionale della proteina. Infatti, l'ubiquitinazione ne determina la ritenzione nel citoplasma, mentre la sumoilazione porta alla formazione di “nuclear bodies” contenenti la proteina e all'accumulo di molecole di Tax sumoilate nel nucleo (Lamsoul et al, 2005). A seguito della purificazione con Ni-NTA è stato possibile identificare per la prima volta osservate forme ubiquitinate e sumoilate della proteina Tax-2B (Fig. 16).

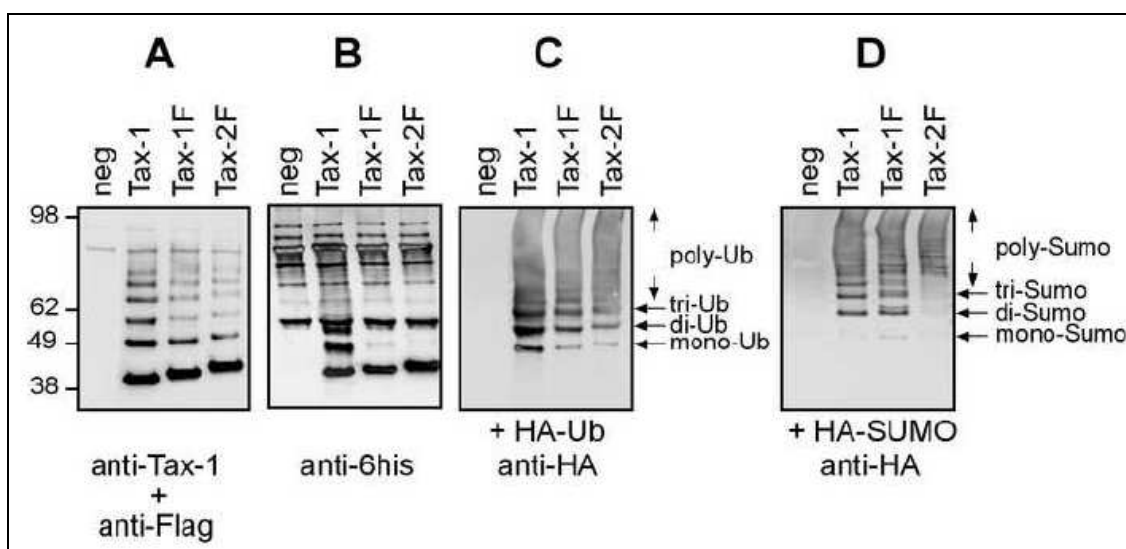


Fig. 16. Risultato della purificazione con Ni-NTA e della rilevazione su immunoblotting con diversi anticorpi (A, B, C e D) delle proteine Tax-1, Tax-1F e Tax-2F.

7.1.4 LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI TAX-1 E TAX-2B

E' stata confrontata la localizzazione intracellulare di Tax-1F e Tax-2F mediante microscopia confocale.

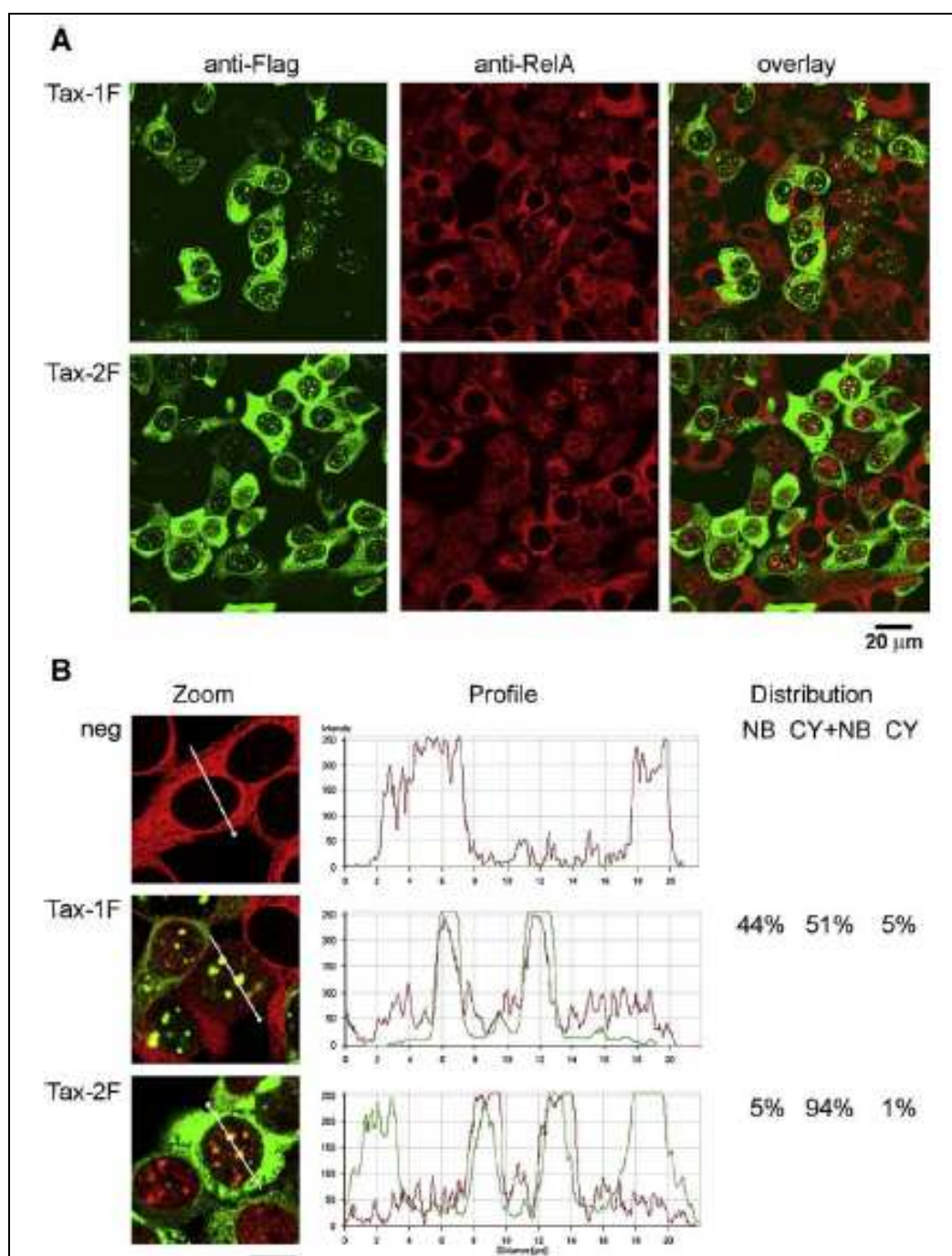


Fig 17. Risultati dell'analisi in microscopia confocale per la distribuzione intracellulare delle proteine Tax-1F e Tax-2F.

Come è possibile osservare nella Fig. 17, entrambe le proteine sono state ritrovate esclusivamente nei “nuclear bodies” (NB), nel citoplasma (CY) o in entrambi questi compartimenti (CY + NB), ma in proporzioni diverse per le due proteine. L'analisi di 300 cellule trasfettate con Tax-1F ha per messo di osservare che la proteina è localizzata nel 44% dei casi nei NB, nel 5% nel citoplasma e nel 51% in entrambi i

compartimenti. L'analisi dello stesso numero di cellule per Tax-2B, ha evidenziato che questa proteina si trova localizzata nei NB nel 5% dei casi, nel citoplasma nell'1% e in entrambi i compartimenti nel 94%. Inoltre, questa analisi ha permesso di osservare che l'espressione di Tax-2B è in grado di indurre la migrazione di RelA dal citoplasma al nucleo, come precedentemente osservato per Tax-1 (Bex et al., 1997).

In conclusione, i risultati ottenuti in questo primo progetto di ricerca si sono rivelati particolarmente innovativi in quanto è stato messo a punto un sistema che permette la rilevazione ed il confronto di Tax-1 e Tax-2B, senza interferire con l'attività transattivante delle due proteine. Inoltre, sono state osservate per la prima volta le forme ubiquitinate e sumoilate della proteina Tax-2B.

Grazie al nuovo sistema di identificazione Flag-His è stata, inoltre, confrontata la localizzazione intracellulare delle due proteine e ciò ha permesso di osservare che la proteina Tax-2B si trova più frequentemente localizzata contemporaneamente nel citoplasma e nei "nuclear bodies" (94%) rispetto a Tax-1 (51%).

7.2 ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DI HTLV-2

La seconda linea di ricerca è stata focalizzata sullo studio dei livelli di espressione dei diversi trascritti del virus HTLV-2. In particolare, questo progetto di ricerca si è prefisso di evidenziare eventuali differenze di espressione nei diversi stadi di infezione del virus e in diversi sistemi cellulari.

7.2.1 TIPOLOGIE DI CAMPIONI ANALIZZATI

Per lo studio ci si è avvalsi di diverse tipologie di cellule infettate da HTLV-2, in particolar: tre linee cellulari in coltura infettate con due diversi sottotipi del virus (HTLV-2A e HTLV-2B) e PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) ottenuti da un paziente italiano infettato da HTLV-2B.

Inizialmente, l'analisi è stata condotta su cellule in fase esponenziale di crescita. Successivamente, le cellule sono state studiate a diversi tempi dalla messa in coltura,

allo scopo di monitorare le cinetiche di espressione dei vari geni a diverse fasi del ciclo di infezione virale.

7.2.2 ANALISI TAQMAN REAL-TIME PCR

Per l'analisi è stata utilizzata la metodica Taqman Real-Time RT-PCR che prevede un'amplificazione del trascritto a partire dal cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione del RNA totale. Questa metodica permette la quantificazione della quantità iniziale dei trascritti in modo molto specifico ed accurato. In particolare, l'impiego di sonde Taqman permette di aumentare la specificità e la sensibilità dell'analisi grazie alla combinazione di amplificazione e ibridazione.

7.2.3 MESSA A PUNTO DELLA METODOLOGIA DI ESTRAZIONE E RETROTRASCRIZIONE DEL RNA

Una delle principali difficoltà incontrate nello sviluppo di questo progetto ha riguardato la necessità di rilevare quantità molto basse di trascritti virali. Ciò si rivela particolarmente importante nel momento in cui l'analisi viene condotta su cellule estratte dal sangue di pazienti infettati da HTLV-2. In questi soggetti, infatti, la percentuale di cellule infettate non è superiore al 5%. Ne consegue che le fasi preliminari di messa a punto della parte metodologica rivestono un ruolo determinante, in particolare nella scelta del sistema di estrazione e di retrotrascrizione del RNA. Il protocollo metodologico deve essere efficiente, attendibile e riproducibile.

Per l'estrazione del RNA è stato scelto il reagente TRIzol® che permette di ottenere buone rese di materiale estratto e di buona qualità, e con un costo inferiore rispetto ad altri prodotti commerciali.

Il RNA estratto è stato sottoposto al controllo di qualità e di integrità. Per questa analisi sono stati utilizzati due diversi strumenti: il NanoDrop ND 1000 e il Bioanalyzer (Agilent).

Lo strumento NanoDrop è uno spettrofotometro UV Visibile che sfrutta la tecnologia basata sulla misura della tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. Lo strumento è in grado

di creare una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, il che consente una quantificazione molto accurata. Il RNA estratto è stato analizzato con questo strumento e, a titolo esemplificativo, nella Fig. 18 è riportato il risultato di una di queste analisi.

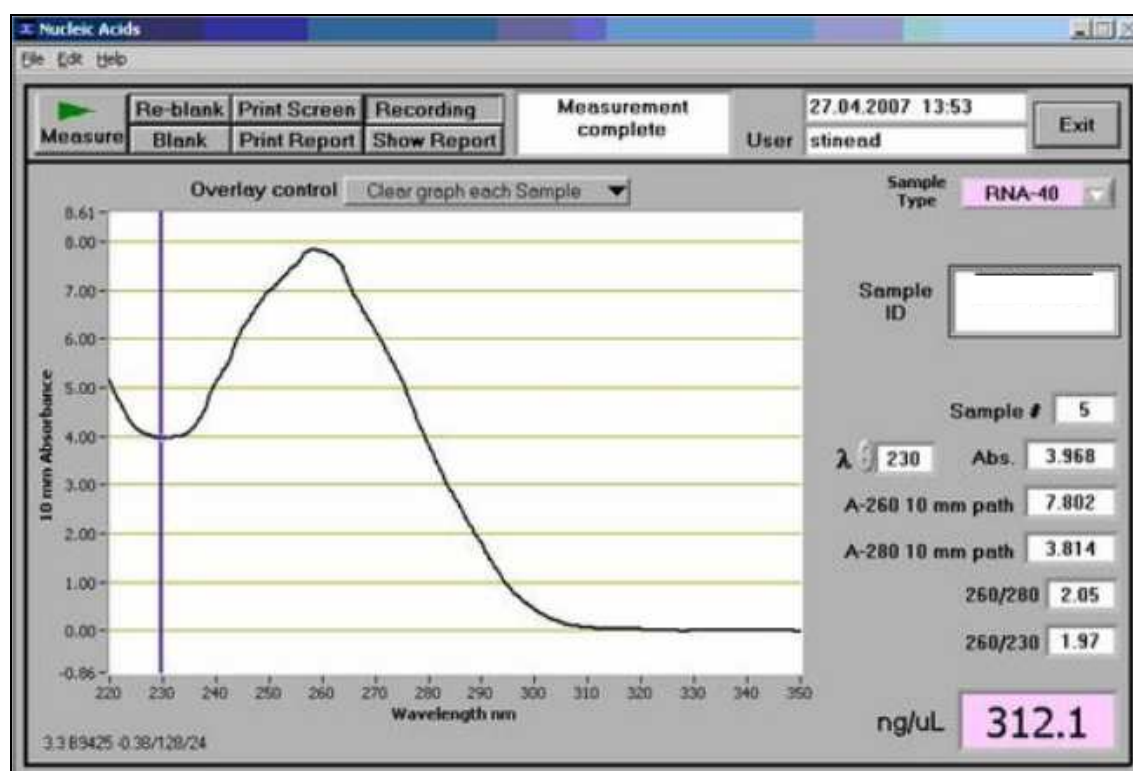


Fig. 18. Risultato dell'analisi condotta mediante lo strumento NanoDrop di uno degli RNA estratti.

Per l'analisi dell'integrità del RNA è stato utilizzato lo strumento Bioanalyzer (Agilent) che mediante una elettroforesi microcapillare su chip restituisce un profilo di corsa elettroforetica ed un interferogramma del campione in formato digitale. Nella Fig. 19 è riportato, a titolo esemplificativo, il risultato dell'analisi condotta sul RNA estratto dalla linea cellulare C344 Mo.

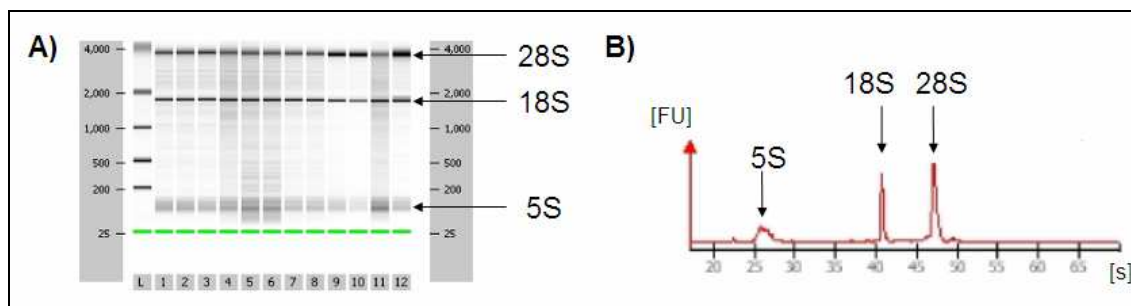


Fig. 19. Risultato dell'analisi condotta con lo strumento Bioanalyzer (Agilent) sul RNA estratto. Lo strumento restituisce un profilo di corsa elettroforetica (A) ed un interferogramma (B) in formato digitale. Nella colonna 9 della parte A) e nella parte B) della figura è visibile il risultato dell'analisi condotta sul RNA estratto dalle cellule C344 Mo.

Per la retrotrascrizione sono state saggiate due diverse retrotrascrittasi (RT), in combinazione con trattamenti di DNasi a diverse concentrazioni. Il kit commerciale di retrotrascrizione QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), che prevede anche un passaggio per l'eliminazione del DNA genomico potenzialmente presente nella miscela di RNA estratto, si è rivelato il più efficiente e riproducibile.

7.2.4 MESSA A PUNTO DELLE REAZIONI DI AMPLIFICAZIONE

La messa a punto della reazione di amplificazione ha richiesto particolari attenzioni. Per il disegno dei primer e delle sonde da utilizzare in Real-Time PCR, si è fatto riferimento alle condizioni descritte in un lavoro pubblicato recentemente (Li e Green, 2007). I primer e le sonde utilizzati nel lavoro citato sono stati inizialmente analizzati mediante confronto delle sequenze in banca dati con il programma Blast, al fine di verificarne la specificità per i geni virali dei sottotipi di HTLV-2 oggetto del nostro studio. Alcuni dei primer presenti nel lavoro citato sono stati modificati, adattandoli alle nostre condizioni sperimentali, per aumentare la specificità per il sottotipo HTLV-2B analizzato in questa tesi.

Nella Fig. 20 è visibile la strategia che è stata utilizzata per discriminare ogni trascritto in maniera specifica durante l'amplificazione. A tale scopo, per la rilevazione dei trascritti che vanno incontro a singolo o doppio splicing sono stati studiati dei primer a cavallo delle zone di splicing, con circa cinque nucleotidi al 3' del sito donatore di splicing e i rimanenti al 5' del sito accettore.

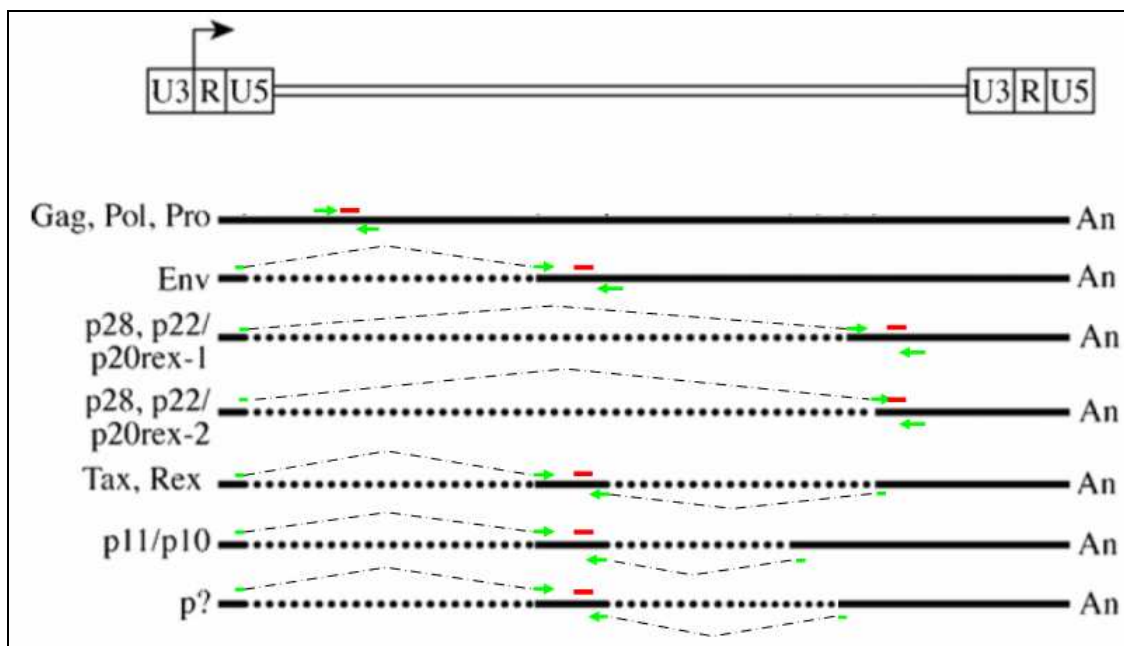


Fig. 20. Schema riassuntivo dei primer e delle sonde utilizzate in Real Time PCR per l'amplificazione dei sette diversi trascritti di HTLV-2. Le frecce verdi e le linee rosse indicano, rispettivamente, le zone in cui sono stati disegnati i primer e le sonde.

Nella fase preliminare sono state allestite delle reazioni di PCR utilizzando le stesse condizioni in cui sono state successivamente condotte le analisi Real-Time (medesimi reagenti, quantità di cDNA, temperature e cicli di amplificazione). Inizialmente i prodotti di queste reazioni non sono stati analizzati in termini di fluorescenza, ma controllati su gel di agarosio e, successivamente, clonati all'interno del vettore pBlueScript. Questa procedura è stata seguita per verificare che la reazione di amplificazione producesse un unico frammento e della dimensione attesa e per controllare, attraverso sequenziamento, che l'amplicone ottenuto corrispondesse a quello di interesse. Nella Fig. 21 è riportato, a titolo esemplificativo, il risultato dell'amplificazione del trascritto per le proteine Tax/Rex (Fig. 21 A) e l'analisi di omologia di sequenza (Fig. 21 B) dell'amplicato ottenuto, effettuata con il programma Blast che ne ha confermato la corrispondenza con il trascritto d'interesse.

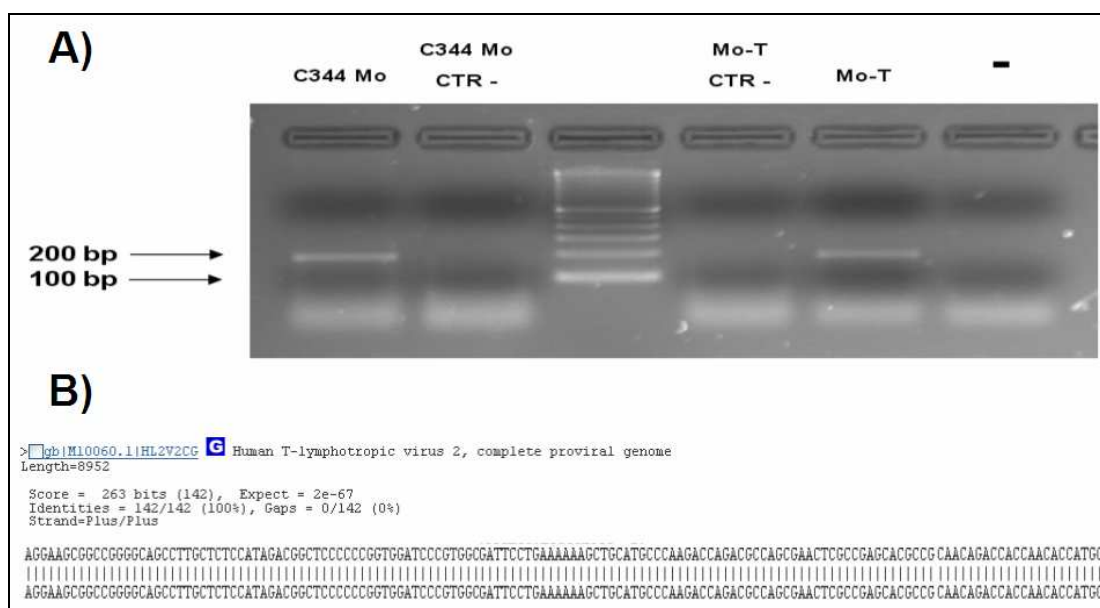


Fig. 21. A) Risultato dell'amplificazione relativa al trascritto per le proteine Tax/Rex esaminata su gel di agarosio. Nella prima e nella quinta colonna sono visibili gli amplificati ottenuti dal RNA estratto, dalle linee cellulari infettate da HTLV-2 C344 Mo ed MoT. Nella seconda e nella quarta colonna sono stati caricati gli amplificati dei controlli negativi della retrotrascrizione. Nella sesta colonna è stato caricato il controllo negativo della reazione di PCR. B) Confronto in banca dati del sequenziamento del costrutto ottenuto dal clonaggio della banda mostrata nella prima colonna della parte A della figura.

I costrutti contenenti gli amplificati, inoltre, sono stati utilizzati come standard interni della reazione di Real-Time PCR per la quantificazione dei livelli di espressione dei diversi trascritti.

Nel corso della messa a punto dell'analisi Real-Time sono stati saggiati tre diversi tipi di DNA polimerasi e i migliori risultati sono stati ottenuti con la RealMasterMix Probe (5PRIME).

Per ogni trascritto sono state ottimizzate le condizioni di reazione (concentrazione di primer e sonde, temperature e cicli di amplificazione) generando delle curve standard mediante l'utilizzo di diluizioni seriali dei plasmidi contenenti le porzioni da amplificare.

Come sequenza standard interna necessaria per la normalizzazione della reazione è stato utilizzato il 18SrRNA ed, in particolare, il kit commerciale "Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control" (Applied Biosystem) che contiene una miscela di primer e sonde disegnati su una regione non specificata.

Nella Tab. 8 sono riportati i valori di concentrazione di primer e sonde che si sono rivelati ottimali per ciascun trascritto a seguito della generazione di matrici di concentrazioni.

TRASCRITTO	PRIMER SENSO (nM)	PRIMER ANTISENSO (nM)	SONDA (nM)
gag/pol	300	300	200
env	600	600	200
tax/rax	300	150	200
p28, p22/p20rex-1	300	300	200
p28, p22/p20rex-2	300	300	200
p10/p11	300	300	200
p?	300	300	200

Tab. 8. Concentrazioni di primer e sonde utilizzati per ciascun trascritto. Le concentrazioni utilizzate per il trascritto 18SrRNA non sono riportati in quanto non sono specificati dalla ditta.

Per quanto riguarda le temperature e i cicli di amplificazione, per alcuni trascritti (p28,p22/rax-1, p10/p11 e p?) è stato necessario modificare il protocollo standard suggerito dalla ditta produttrice della mix di reazione RealMasterMix Probe (5PRIME). Nella Tab. 9 sono riportati i protocolli di amplificazione utilizzati per i diversi trascritti.

TRASCRITTO	DENATURAZIONE INIZIALE	CICLI DI AMPLIFICAZIONE (X45)		
		DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
18SrRNA	94°C x 2 minuti	94°C x 15 secondi	60°C x 1 minuto	
gag/pol				
env				
tax/rax				
p28, p22/p20rex-2				
p28, p22/p20rex-1	94°C x 2 minuti	94°C x 15 secondi	58°C x 30 secondi	72°C x 30 secondi
p10/p11				
p?				

Tab. 9. Protocolli di amplificazione di PCR per i diversi trascritti di HTLV-2.

7.2.5 QUANTIFICAZIONI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DI HTLV-2

Per la quantificazione dei livelli di espressione dei diversi trascritti sono state generate delle curve standard utilizzando diluizioni seriali dei costrutti contenenti le regioni d'interesse. L'analisi Real-Time RT-PCR permette, infatti, di determinare la concentrazione di DNA del campione da analizzare a partire da standard a concentrazione nota. Sono state considerate attendibili le reazioni che hanno mostrato un'efficienza di amplificazione superiore al 90% e valori di R^2 maggiori di 0,98.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato ed è stata ottenuta una deviazione standard inferiore a 0,2.

I limiti di detezone inferiore e superiore testati rispetto al numero di copie del trascritto normalizzatore 18SrRNA e di ciascun trascritto di HTLV-2, sono riportati schematicamente nella Tab. 10.

TRASCritto	LIMITE INFERIORE DI DETEZIONE (n° di copie)	LIMITE SUPERIORE DI DETEZIONE (n° di copie)
18SrRNA	1,00E+02	1,00E+06
gag/pol	1,00E+02	1,00E+07
env	3,00E+01	1,00E+06
tax/rex	5,00E+02	5,00E+06
p28, p22/p20rex-1	5,00E+01	1,00E+06
p28, p22/p20rex-2	5,00E+01	1,00E+06
p10/p11	1,00E+02	1,00E+05
p?	5,00E+02	3,00E+04

Tab. 10. Limiti di detezone testati del numero di copie del trascritto normalizzatore 18SrRNA e dei diversi trascritti di HTLV-2.

7.2.6 ANALISI DI COLTURE CELLULARI IN FASE ESPONENZIALE DI CRESCITA

Una volta messa a punto la metodologia di amplificazione, il lavoro sperimentale ha previsto, inizialmente, lo studio di diverse linee cellulari stabilmente infettate da HTLV-2, analizzate in fase esponenziale di crescita. A questo scopo sono state utilizzate due linee cellulari T, infettate dal sottotipo HTLV-2A (C344 Mo e Mo-T) ed una linea cellulare B, infettata dal sottotipo HTLV-2B (BJAB-Gu).

Il numero di copie rilevato per i diversi trascritti è stato normalizzato a quello del trascritto del 18SrRNA e moltiplicato per un fattore 10^7 .

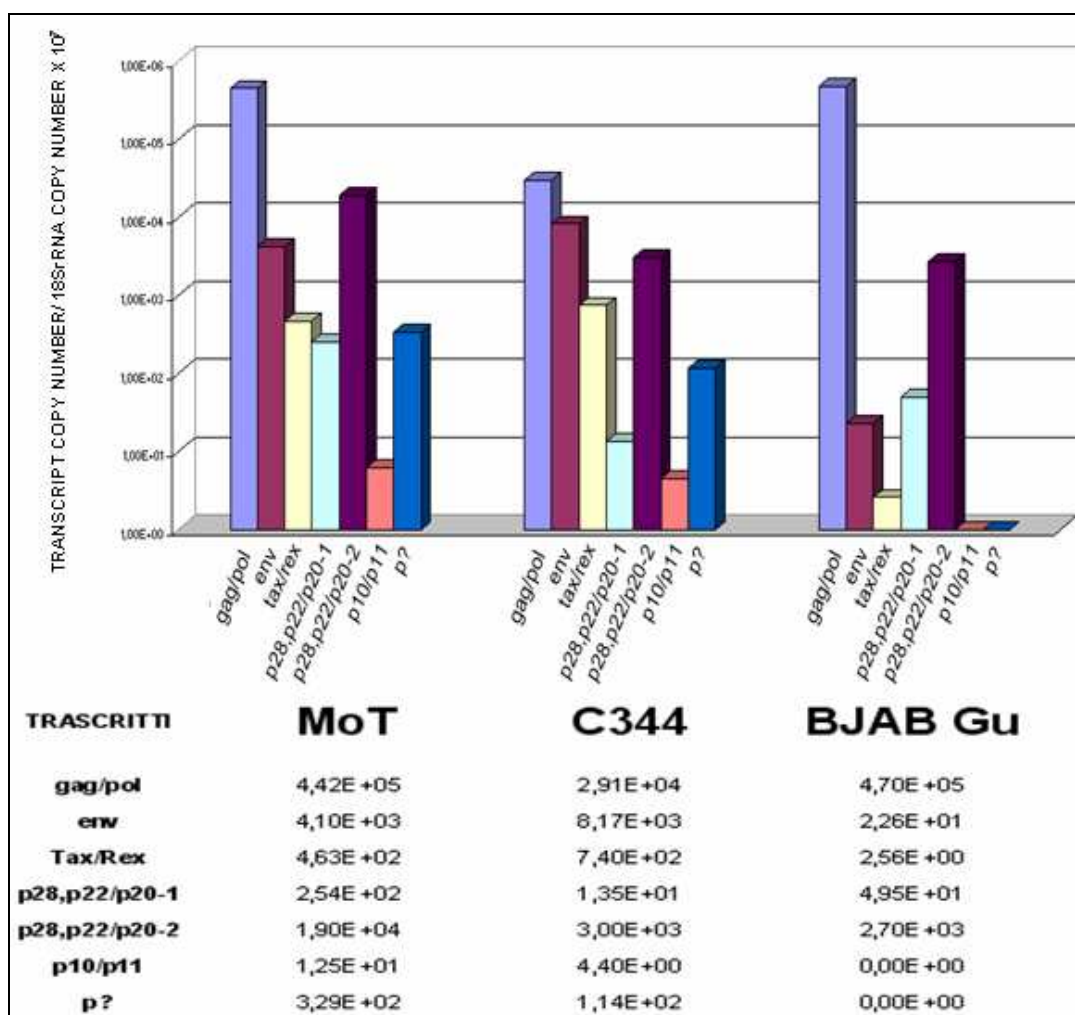


Fig. 22. Risultato dell'amplificazione dei trascritti di HTLV-2 per le tre linee cellulari MoT, C344 Mo e BJAB-Gu analizzate in fase esponenziale di crescita. Il numero di copie dei diversi trascritti è stato normalizzato relativamente a quello del trascritto del 18SrRNA e moltiplicato per un fattore di 107. I trascritti p28,p22/p20rex-1 e p28,p22/p20rex-2 sono stati abbreviati rispettivamente in p28,p22/p20-1 e p28,p22/p20-2.

Nella Fig. 22 sono riportati i risultati ottenuti in questi esperimenti. Come è possibile osservare, sono stati ottenuti livelli di espressione simili per le due linee cellulari T (C344 Mo e Mo-T) mentre la linea cellulare B (BJAB-Gu) ha mostrato un pattern diverso.

Il trascritto gag/pol è risultato come il più abbondante in tutte le linee cellulari analizzate. Il livello di espressione di env è risultato comparabile nelle due linee cellulari T ma inferiore di circa 2 ordini di grandezza nella linea B, rispetto alle linee T.

Il trascritto tax/rex della linea Mo-T è risultato dello stesso ordine di grandezza dei trascritti p28,p22/p20rex-1 e p? e inferiore di circa 40 volte rispetto a p28,p22/p20rex-2; nella linea C344 è risultato quattro volte inferiore a p28,p22/p20rex-2 e, nella linea BJAB-Gu, 19 e 1000 volte meno abbondante rispettivamente di

p28,p22/p20rex-1 e p28,p22/p20rex-2. Questo esperimento ha, quindi, evidenziato che il trascritto tax/rex presenta un'alta variabilità di espressione fra le linee T e la linea B.

Fra i trascritti relativi alle proteine accessorie, p28,p22/p20rex-2 è risultato il più abbondante in tutte le tre linee analizzate. In particolare, nella linea Mo-T supera p28,p22/p20rex-1 e p? di circa 60 volte e p10/p11 di 1500 volte. Nella linea C344 risulta più abbondante di 25 e 680 volte rispetto agli altri trascritti accessori e nella linea BJAB-Gu è risultato circa 50 volte più abbondante di p28,p22/p20rex-1. E' stato osservato, quindi, che, nella produzione dei trascritti che daranno origine alle proteine p28, p22 e p20rex, viene utilizzato preferenzialmente il sito accettore di splicing al nucleotide in posizione 6900 rispetto a quello in posizione 6630.

Nella linea cellulare BJAB-Gu, i trascritti p10/p11 e p? sono risultati al di sotto del limite di rilevazione e non è quindi stato possibile procedere con la quantificazione.

Alla luce di questi risultati si è cercato di dare una spiegazione al diverso profilo ottenuto per la linea cellulare BJAB-Gu. L'attenzione si è concentrata in particolare sui trascritti che mostrano livelli di espressione significativamente più bassi rispetto a quelli rilevati per le altre due linee cellulari e, quindi, su env, tax/rex, p10/p11 e p?. Per l'amplificazione di questi trascritti, infatti, come è possibile osservare dalla Fig. 20, viene utilizzato lo stesso primer senso, in quanto effettuano tutti lo splicing che porta all'unione dell'esone 1 all'esone 2.

Fra questi trascritti, in particolare su quello per le proteine Tax/Rex, è stato disegnato un nuovo set di primer e sonda che fossero ugualmente specifici ma che non prevedessero l'amplificazione della zona a cavallo fra l'esone 1 e l'esone 2. Nella Fig. 23 è visibile il confronto fra l'antecedente (A) ed il nuovo (B) schema per la costruzione del sistema primer/sonda.

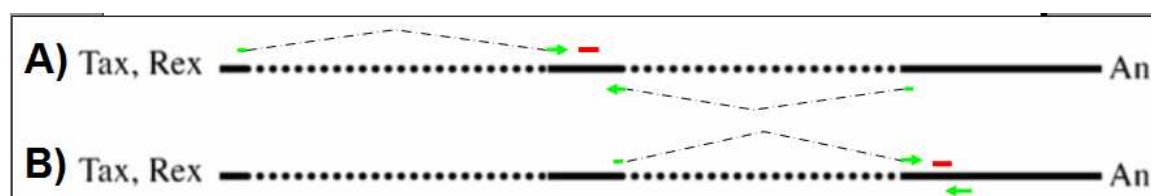


Fig. 23. Confronto fra l'antecedente ed il nuovo schema di primer e sonde per il trascritto per le proteine Tax/Rex. Le frecce verdi e le linee rosse indicano, rispettivamente, le zone in cui sono stati disegnati i primer e le sonde.

E' stata ripetuta l'amplificazione del trascritto per le proteine Tax/Rex utilizzando questo nuovo sistema di primer/sonda sulle tre linee cellulari e i risultati sono riportati in Fig. 24.

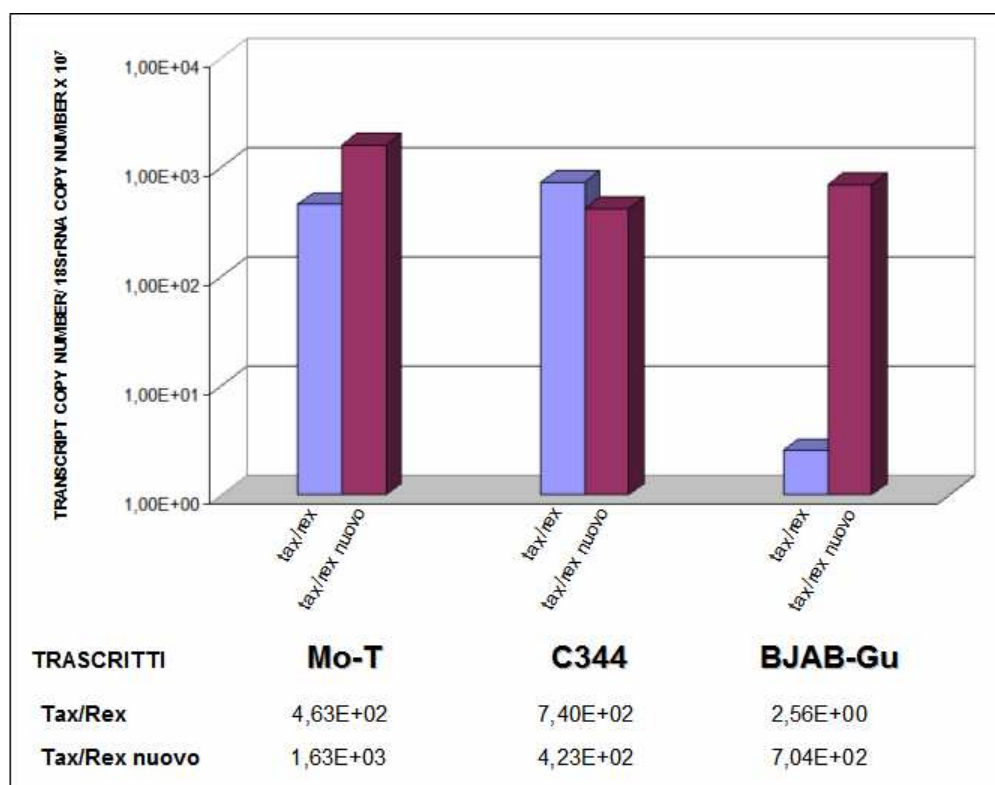


Fig. 24. Risultato dell'amplificazione del trascritto tax/rex per le tre linee cellulari MoT, C344 e BJAB-Gu, con il vecchio e il nuovo disegno di primer. Il numero di copie del trascritto è stato normalizzato a quello del trascritto del 18SrRNA e moltiplicato per un fattore di 10^7 .

Come è possibile osservare, la nuova combinazione di primer e sonda ha permesso di ottenere, solo per la linea BJAB-Gu, livelli di espressione del trascritto tax/rex significativamente superiori rispetto a quelli ottenuti con il primo sistema, mentre per le altre due linee cellulari sono stati ottenuti livelli d'espressione comparabili a quelli ottenuti con il sistema antecedente. Questo risultato suggerisce che questa linea cellulare presenti dei genomi HTLV-2 difettivi che non permettono un corretto splicing fra l'esone 1 e l'esone 2 e che influiscono ugualmente sull'espressione di questo trascritto.

7.2.7 ANALISI DELLA CINETICA D'ESPRESSIONE DELLA LINEA CELLULARE BJAB-Gu

E' stata analizzata la cinetica di espressione dei diversi trascritti di HTLV-2B nella linea BJAB-Gu. Al fine di sincronizzare l'espressione virale, le cellule sono state piastrate ad un decimo della loro concentrazione ottimale, diluendo dieci volte le cellule

in crescita esponenziale con il mezzo di coltura. Le cellule sono state prelevate ed analizzate ogni 24 ore dato che questo periodo dovrebbe coincidere con il ciclo di divisione cellulare di questa linea cellulare. Nella Fig. 25 sono riportati i risultati ottenuti.

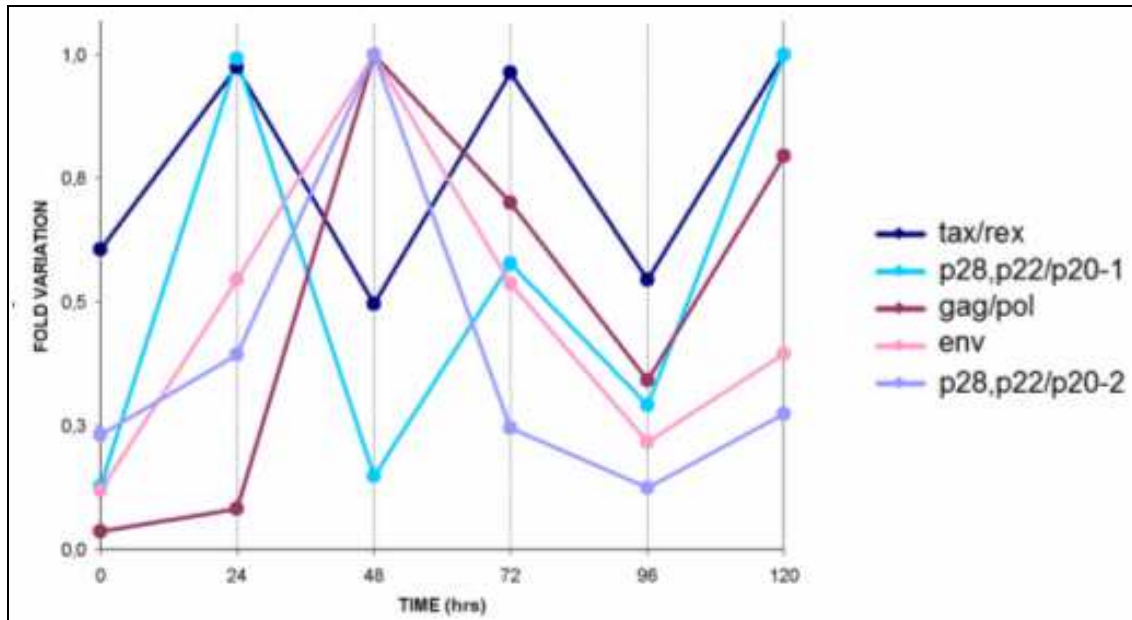


Fig. 25. Risultato dello studio della cinetica di espressione di alcuni trascritti di HTLV-2B per la linea cellulare BJAB-Gu. Le cellule sono state piastrate ad un decimo della loro concentrazione ottimale ed analizzate ogni 24 ore.

Come è possibile osservare, i trascritti di tax/rex e p28,p22/p20rex-1 presentano un profilo di espressione precoce con un ciclo di circa 48 ore, in quanto sono stati riscontrati dei picchi di valori massimi a 24, 72 e 120 ore e inferiori 0, 48 e 96 ore. I trascritti gag/pol, env e p28,p22/p20rex-2 hanno presentato una cinetica di espressione tardiva con un ciclo di circa 96 ore, in quanto i valori massimi sono stati rilevati a 48 e 120 ore, mentre a 96 ore sono stati osservati dei livelli inferiori per questi trascritti. Nella stessa figura non sono riportati i risultati ottenuti per i trascritti p10/p11 e p? in quanto i valori rilevati si trovavano al di sotto del limite inferiore di risoluzione.

Per quanto riguarda il trascritto per le proteine Tax/Rex, in questo grafico è riportato il risultato dell'amplificazione effettuata con il nuovo sistema di primer e sonda in quanto con il sistema antecedente il numero di copie risultava inferiore al limite minimo di rilevazione. Questo metodo di quantificazione, come detto in precedenza, potrebbe però non tener conto degli eventuali genomi difettivi presenti in questa linea cellulare.

7.2.8 ANALISI DELLA CINETICA D'ESPRESSIONE DELLA LINEA CELLULARE C344 Mo

Successivamente, è stata analizzata la cinetica di espressione dei diversi trascritti di HTLV-2A nella linea cellulare C344 Mo. Anche in questo caso, al fine di sincronizzare l'espressione virale, le cellule sono state piastrate ad un decimo della loro concentrazione ottimale, diluendo dieci volte le cellule in crescita esponenziale con il mezzo di coltura. Le cellule sono state prelevate ed analizzate a 0, 24, 48, 96, 144, 192 e 256 ore. Nella Fig. 26 sono riportati i risultati ottenuti.

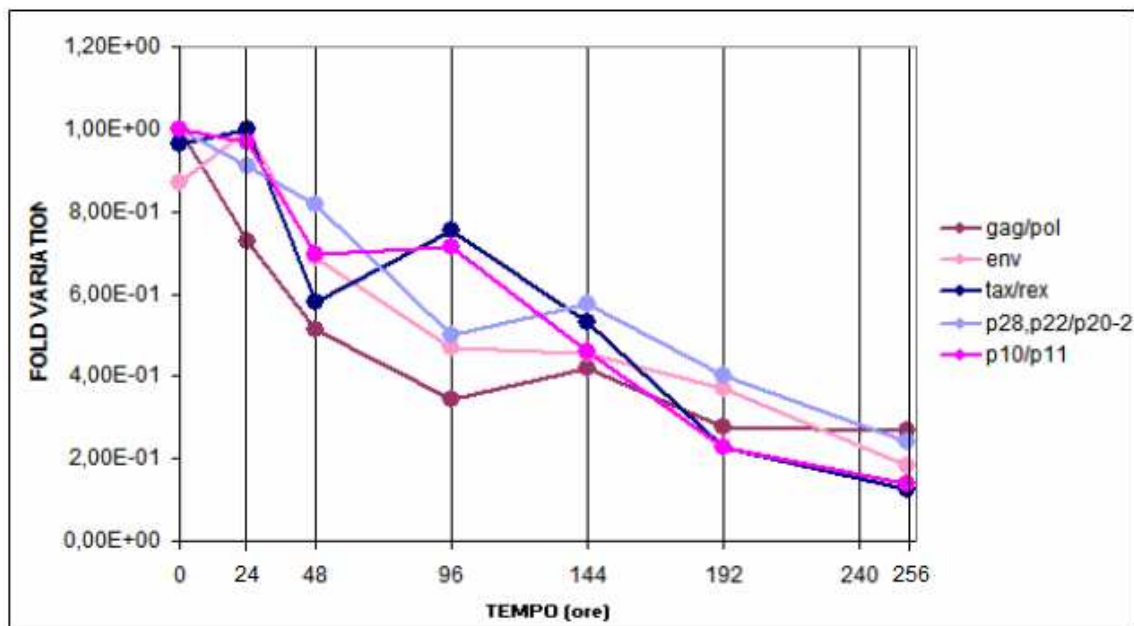


Fig. 26. Risultato dello studio della cinetica di espressione di alcuni trascritti di HTLV-2A per la linea cellulare C344 Mo. Le cellule sono state piastrate ad un decimo della loro concentrazione ottimale ed analizzate a 0, 24, 48, 96, 144, 192 e 256 ore. Il trascritto p28,p22/p20rex-2 è stato abbreviato in p28,p22/p20-2.

Come è possibile osservare, tutti i trascritti analizzati hanno mostrato un picco di espressione nelle prime 24 ore dell'esperimento con un successivo decremento. Per quanto riguarda i trascritti tax/rex e p10/p11, è stato rilevato un andamento decrescente fino a 48 ore ed un ulteriore picco di espressione a 96 ore. I trascritti gag/pol e p28,p22/p20rex-2 hanno mostrato entrambi un andamento decrescente fino a 96 ore, un successivo incremento di espressione con un picco a 144 ore ed un ulteriore andamento decrescente. Alla luce di questi risultati è stato ipotizzato che in questo esperimento vi sia stato un progressivo silenziamento dell'espressione genica virale dopo 144 ore dalla piastratura iniziale delle cellule.

7.2.9 ANALISI DELLA CINETICA DI RIATTIVAZIONE DEL VIRUS IN PBMC

L'analisi dei trascritti di HTLV-2B è stata condotta utilizzando PBMC criopreservati provenienti da un paziente italiano infettato con il sottotipo HTLV-2B. Allo scopo di analizzare la cinetica di riattivazione del virus, le cellule infettate sono state messe in coltura e sono state prelevate e analizzate a 4, 14 e 20 ore. Questa analisi è stata condotta per un periodo di tempo piuttosto breve dato che il numero di cellule a disposizione non era consistente e, a seguito dello scongelamento, molte di esse non sono risultate vitali. Inoltre, l'esperimento è stato condotto senza aggiunta di fattori di crescita e a 20 ore dalla messa in coltura le cellule sono apparse sofferenti. La quantità di RNA estratto dai tre campionamenti (T1, T2 e T3) è risultata bassa (circa 2300 ng per T0, 5400 per T1 e 3600 per T2) e, quindi, non è stato possibile analizzare i livelli di espressione di tutti i trascritti. In Fig. 27 è mostrato il risultato dell'analisi per i trascritti tax/rex, gag/pol, p28,p22/p20rex-1 e p28,p22/p20rex-2.

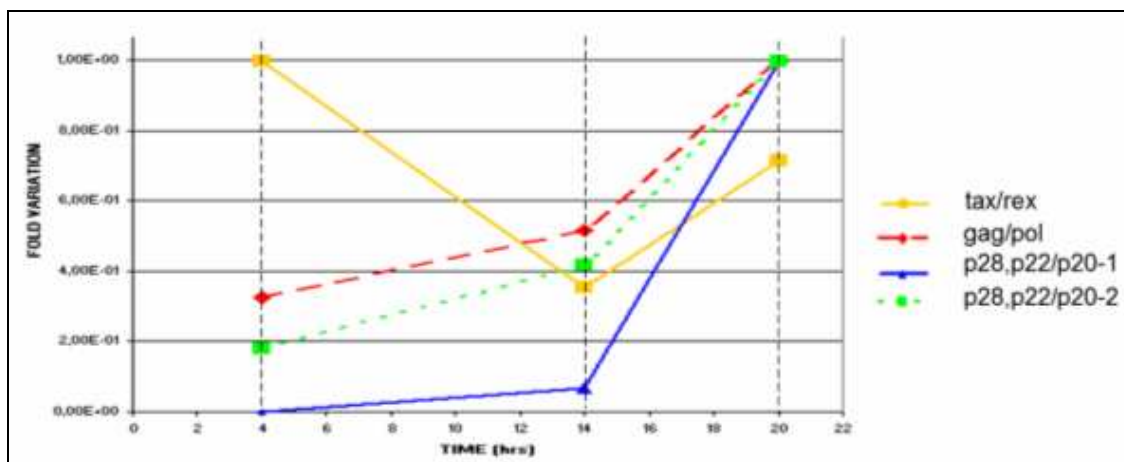


Fig. 27. Risultato dell'amplificazione di alcuni trascritti di HTLV-2 per i PBMCs di un paziente infettato. Le cellule sono state scongelate, coltivate e analizzate a 4, 14 e 20 ore.

Come è possibile osservare nella figura, il trascritto per le proteine Tax/Rex ha mostrato un andamento precoce e bifasico, con un picco di espressione a 4 ore dalla messa in coltura, valori inferiori dopo 14 ore e un nuovo picco a 20 ore. Anche in questo caso, per l'analisi di questo trascritto è stato utilizzato il nuovo sistema di primer e sonda, in quanto con il sistema antecedente il numero di copie risultava inferiore al limite minimo di rilevazione.

Per quanto riguarda, invece, i trascritti gag/pol e delle proteine accessorie p28,p22/p20rex-1 e -2, è stato osservato un aumento graduale e tardivo dei livelli di espressione, con un picco massimo a 20 ore. Il trascritto env è stato analizzato ma non è stato possibile rilevarlo.

I risultati ottenuti suggeriscono che il trascritto tax/rex è necessario all'inizio del ciclo di infezione per transattivare e regolare la trascrizione virale e cellulare, mentre gli altri trascritti sono necessari successivamente, in quanto codificano per proteine strutturali ed accessorie.

8. DISCUSSIONE

Fra i retrovirus umani HTLV i tipi più diffusi e studiati sono HTLV-1 ed HTLV-2. Nonostante presentino un'elevata omologia di sequenza nucleotidica (70%), HTLV-1 risulta più patogenico di HTLV-2 (Araujo e Hall, 2004; Matsuoka e Jeang, 2007) e per questo motivo, l'attenzione della comunità scientifica si è da sempre concentrata maggiormente su di esso. Il nostro laboratorio lavora da anni allo studio di HTLV-2 in quanto endemico in Europa e, soprattutto, in Italia (Zella et al., 1990) e, più recentemente, sul confronto fra HTLV-1 e HTLV-2.

La differente patogenicità dei due virus sembra possa essere attribuita alle differenti caratteristiche delle rispettive proteine transattivatrici Tax-1 e Tax-2 (Lewis et al., 2002).

Durante questi tre anni di dottorato sono stati seguiti due filoni di ricerca. Inizialmente, l'attenzione è stata concentrata sul confronto fra le proteine Tax di HTLV-1 e HTLV-2B (rispettivamente Tax-1 e Tax-2B), allo scopo di evidenziare differenze che potessero eventualmente spiegare la diversa patogenicità dei due virus. Inoltre, sono state analizzate le possibili modificazioni post-traduzionali della proteina Tax-2B dato che le informazioni a riguardo risultavano praticamente inesistenti.

Successivamente, è stata seguita una seconda linea di ricerca centrata sullo studio dei livelli di espressione dei trascritti di HTLV-2 in diversi sistemi cellulari e a diversi stati di infezione del virus.

8.1 LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DELLA PROTEINA TAX DI HTLV E SUE MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI

Nello sviluppo di questo progetto sono stati ottenuti risultati largamente innovativi che sono stati recentemente pubblicati sulla rivista *Virology* (Turci et al., 2009). In questo lavoro è stato dimostrato che Tax-2B, che presenta una omologia di sequenza aminoacidica del 85% con Tax-1, è anch'essa ubiquitinata e sumoilata. Tax-2B è stata ritrovata sia nel citoplasma che in "nuclear bodies". È stato osservato che questa proteina è in grado di indurre la traslocazione della subunità RelA di NF-κB e il suo reclutamento in "nuclear bodies", come è stato già osservato per Tax-1 (Lamsoul et al., 2005). Il confronto è stato reso attendibile dal fatto che sono state analizzate entrambe per mezzo dell'impiego del medesimo sistema di rilevazione. A questo scopo, è stato inserito un tag interno alle proteine (Flag-6His, abbreviato come "F")

dimostrando che non influiva sull'attività trascrizionale e che permetteva la rilevazione per mezzo di un unico anticorpo anti Flag.

La localizzazione intracellulare della proteina Tax-2 è stata ritenuta come prevalentemente localizzata a livello citoplasmatico in numerosi studi (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004a; Semmes et al., 1996; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2006). Grazie al nuovo sistema di rilevazione messo a punto nel nostro laboratorio è stato dimostrato che Tax-2B si ritrova localizzata sia nel citoplasma che nei “nuclear bodies” nella maggior parte delle cellule.

Inoltre, questo studio ha fornito per la prima volta l'evidenza della presenza di forme ubiquitinate e sumoilate di Tax-2B. In particolare, per questa proteina è stata osservata una ridotta presenza delle forme mono-, di- e tri-sumoilate rispetto a Tax-1. Questo risultato è in accordo con le ridotte dimensioni dei “nuclear bodies” nei quali si ritrova Tax-2B e con la maggiore distribuzione citoplasmatica di questa proteina rispetto a Tax-1. Questa osservazione è coerente con il fatto che la sumoilazione è un evento chiave per la formazione dei “nuclear bodies” e per la ritenzione di Tax-1 nel nucleo (Lamsoul et al., 2005). In ogni caso, la ridotta presenza delle forme mono-, di- e tri-sumoilate non sembra influire sulla formazione dei “nuclear bodies”, sebbene questi risultino di dimensioni ridotte, né sulla rilocalizzazione di RelA in queste strutture. Ciò potrebbe significare che le forme poli-sumoilate potrebbero essere determinanti nella formazione di queste strutture nucleari. In futuro saranno condotti studi su mutanti di Tax-2B deficienti per la sumoilazione allo scopo di comprendere meglio il ruolo di questo tipo di modificazioni post-traduzionali nella formazione dei “nuclear bodies” e nella loro attività trascrizionale.

In letteratura sono riportati numerosi studi, non sempre concordi, che paragonano l'attività trascrizionale di Tax-1 e Tax-2 (Endo et al., 2002; Lewis et al., 2002; Meertens et al., 2004b; Sieburg et al., 2004; Tanaka et al., 1996; Xie et al., 2006; Niinuma et al., 2005). In questo lavoro, grazie all'impiego di un tag interno alle proteine che non ne modifica l'attività transattivante, è stato osservato che Tax-1 e Tax-2B mostrano una simile efficienza, anche se non identica, nell'attivare l'espressione genica attraverso la via NF- κ B. Dal momento che l'ubiquitinazione e la sumoilazione sono in grado di controllare sia la localizzazione intracellulare che l'attività trascrizionale di Tax, il particolare profilo di sumoilazione osservato per Tax-2B e la variazione nei rapporti fra distribuzione nucleare e citoplasmatica potrebbero spiegare la modesta

riduzione della capacità di questa proteina di attivare l'espressione genica per mezzo della via NF- κ B.

Questo lavoro non è in favore dell'ipotesi che la differente patogenicità di HTLV-1 e HTLV-2 possa essere attribuita esclusivamente alle proprietà legate all'attività transattivante delle rispettive proteine Tax. Sono quindi da prendere in considerazione anche altri determinanti come ad esempio le diverse capacità di Tax-1 e Tax-2B di interagire con proteine contenenti un dominio PDZ, di formare micronuclei, di bloccare l'ematopoiesi o di inibire la funzione trascrizionale della proteina "tumor suppressor" p53. E' possibile che la proteina HBZ recentemente scoperta per HTLV-1 ma non per HTLV-2 possa svolgere un ruolo determinante nella determinazione del profilo patogenico del virus. Altri autori (Endo et al., 2002) hanno ipotizzato che la capacità da parte di Tax-1 e Tax-2 di attivare la via NF- κ B non sia l'unico fattore in grado di influire sulla loro attività trasformante. I risultati da noi ottenuti hanno apportato nuovi elementi a supporto di questa tesi.

8.2 ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DI HTLV-2

Il secondo progetto che è stato trattato durante lo svolgimento del dottorato ha riguardato l'analisi dei livelli d'espressione dei diversi trascritti di HTLV-2. In particolare, l'aspetto più interessante è legato all'analisi della cinetica di espressione dei trascritti e alla loro quantificazione in diversi sistemi cellulari. A tale scopo è stata utilizzata la metodica Real-Time RT-PCR che ha richiesto una particolare messa a punto di tutti i diversi passaggi.

Una delle prime difficoltà incontrate nello sviluppo di questo progetto ha riguardato la scelta del tipo di materiale infettato da HTLV-2 da analizzare. Dal momento che HTLV-2 è ancora poco studiato rispetto ad HTLV-1, risulta piuttosto difficile reperire cellule infettate. Nel nostro caso, il problema è particolarmente evidente per il reperimento di cellule (PBMC) provenienti da pazienti infettati da HTLV-2, in quanto in Italia non essendo ancora prevista l'analisi degli anticorpi contro HTLV-1/2 nel sangue dei donatori, il numero di pazienti monoinfettati da HTLV-2 è limitato. Per questi motivi è stato per ora possibile analizzare i PBMC provenienti da un

solo paziente mono-infettato da HTLV-2. L'analisi è stata, quindi, condotta principalmente su tre linee cellulari stabilmente infettate da HTLV-2.

Un'altra problematica incontrata nello sviluppo di questo progetto riguarda la necessità di rilevare quantità molto basse di trascritti virali, soprattutto per i pazienti infettati da HTLV-2. In questi soggetti, infatti, la percentuale di cellule infettate rappresenta non più del 5%. E' stata, quindi, prestata particolare attenzione alle fasi preliminari di messa a punto della parte metodologica, in quanto il protocollo da seguire deve risultare efficiente, attendibile e riproducibile.

Una volta scelto il metodo di estrazione del RNA da analizzare, sono stati confrontati diversi protocolli di retrotrascrizione e di eliminazione del DNA genomico, potenzialmente presente insieme all'RNA estratto al fine di ottenere una miscela di cDNA rappresentativa del trascrittoma presente all'interno della cellula.

Sulla base di un articolo pubblicato recentemente (Li e Green, 2007), è stato disegnato un pannello di primer e sonde che fossero in grado di discriminare in maniera specifica i diversi trascritti. Per la rilevazione dei trascritti che vanno incontro a singolo o doppio splicing, sono stati studiati dei primer a cavallo delle zone di splicing, con circa cinque nucleotidi posti al 3' del sito donatore di splicing e i rimanenti al 5' del sito accettore.

Una parte consistente del tempo impiegato per la messa a punto della metodologia è stato riservato alla costruzione di vettori plasmidici contenenti le porzioni dei trascritti da amplificare. Tali plasmidi sono stati costruiti da un lato per verificare, mediante sequenziamento, che le regioni amplificate corrispondano effettivamente a quelle attese e, dall'altro, per utilizzarli successivamente per la generazione di curve standard per la quantificazione dei trascritti stessi.

Anche la scelta della DNA polimerasi da utilizzare per l'amplificazione ha richiesto particolari attenzioni, in quanto non tutte quelle testate hanno permesso di ottenere delle reazioni con una buona efficienza (superiore al 90%) e con valori di R^2 maggiori di 0,98.

Il lavoro svolto ha quindi consentito di mettere a punto protocolli metodologici in grado permettere l'identificare e la quantificazione di tutti i diversi trascritti di HTLV-2 in linee cellulari T e B. Nella prima parte del lavoro sono state analizzate linee cellulari in fase esponenziale di crescita, e più precisamente, due linee T stabilmente infettate con HTLV-2A (Mo-T e C344 Mo) ed una linea B infettata con HTLV-2B (BJAB-Gu). L'analisi ha evidenziato pattern di espressione simili per le due linee

cellulari T. Nella linea cellulare B sono stati rilevati bassi livelli del trascritto env il che potrebbe essere anche dovuto al fatto che questo virus si moltiplica preferenzialmente attraverso l'espansione clonale, piuttosto che per formazione di nuovi virioni maturi (Salemi et al., 1999; Eiraku et al., 1998; Wattel et al., 1995; Wattel et al., 1996; Asquith et al., 2005; Asquith et al., 2007). Nelle tre linee cellulari, e in particolar modo nelle linee Mo-T e BJAB-Gu, sono stati rilevati bassi livelli di espressione per il trascritto tax/rex in rapporto ai trascritti accessori il che suggerisce che possa essere dovuto alla presenza di genomi HTLV-2 difettivi in queste linee cellulari che non permettano un corretto splicing di tutti i trascritti e finiscano per influire sull'espressione.

Il carattere innovativo di questa linea di ricerca è legato all'analisi della cinetica dei livelli di espressione dei diversi trascritti di HTLV-2 in linee cellulari e in PBMC ottenuti da pazienti infettati dal virus. In letteratura non sono attualmente presenti studi che analizzino l'espressione virale di HTLV-2 a tempi diversi, riconducibili a diversi stadi di infezione. A questo scopo sono state analizzate la linea cellulare B BJAB-Gu e la linea T C344 Mo. Le cellule sono state messe in coltura ad un decimo della loro concentrazione ottimale e sono state prelevate a tempi diversi sulla base del loro periodo di duplicazione cellulare. L'analisi della linea BJAB-Gu, che ha un tempo di replicazione di 24 ore, ha evidenziato un andamento ciclico dell'espressione virale. In particolare, i trascritti tax/rex e p28,p22/p20rex-1 hanno mostrato un profilo di espressione precoce con un ciclo di circa 48 ore, mentre i trascritti gag/pol, env e p28,p22/p20rex-2 hanno presentato una cinetica di espressione tardiva con un ciclo di circa 96 ore. Questi risultati suggeriscono che nel corso dell'esperimento non si sia verificato un progressivo spegnimento dell'espressione virale che presenta un aumento anche a 120 ore dalla piastratura iniziale. Nella linea T C344 Mo, che ha un tempo di replicazione di 48 ore, tutti i trascritti analizzati hanno mostrato un picco di espressione nelle prime 24 ore, con un progressivo decremento nelle ore successive. Per i trascritti tax/rex e p10/p11 è stato rilevato anche un ulteriore picco di espressione a 96 ore, mentre per i trascritti gag/pol e p28,p22/p20rex-2 il secondo picco di espressione è stato registrato a 144 ore. Questi risultati mostrano che nel corso dell'esperimento si è verificato un progressivo silenziamento dell'espressione genica dopo 144 ore dalla piastratura iniziale delle cellule. Questi risultati hanno messo in evidenza che queste due linee cellulari presentano un pattern temporale di espressione molto diverso.

Inoltre, è stata analizzata la cinetica di espressione dei PBMC criopreservati ottenuti da un paziente italiano infettato da HTLV-2. Queste cellule sono state

scongelate, messe in coltura ed analizzate a 4, 14 e 20 ore. Non è stato possibile procedere oltre con l'analisi in quanto a 20 ore dalla messa in coltura le cellule sono risultate molto sofferenti, probabilmente a causa del fatto che non sono stati aggiunti fattori di crescita al terreno di coltura. Questo esperimento ha evidenziato per il trascritto tax/rex un andamento precoce e bifasico, con un picco di espressione a 4 ore dalla messa in coltura, valori inferiori dopo 14 ore e un nuovo picco a 20 ore. Il trascritto gag/pol e quelli per le proteine accessorie p28,p22/p20rex-1 e -2, hanno mostrato un aumento graduale e tardivo dei livelli di espressione, con un picco massimo a 20 ore. Il trascritto env è stato analizzato ma non è stato possibile rilevarlo. Questi risultati sono stati ricondotti al fatto che il trascritto tax/rex potrebbe essere necessario all'inizio del ciclo di infezione per transattivare e regolare la trascrizione virale e cellulare, mentre gli altri trascritti sarebbero necessari successivamente, in quanto codificano per proteine strutturali ed accessorie.

In conclusione, durante questo dottorato di ricerca sono stati ottenuti risultati innovativi sull'analisi comparativa tra Tax-1 e Tax-2B, grazie alla messa a punto di un sistema per la rilevazione di entrambe le proteine mediante un singolo anticorpo. Le due proteine hanno mostrato una efficienza simile, anche se non identica, nell'attivare l'espressione genica attraverso la via NF- κ B. La proteina Tax-2B si ritrova localizzata sia nel citoplasma che nei "nuclear bodies" nella grande maggioranza delle cellule. Il sistema di rilevazione messo a punto ha permesso di osservare per la prima volta le forme ubiquitinate e sumoilate della proteina Tax-2B.

Il secondo progetto di ricerca ha portato allo sviluppo di un protocollo metodologico per l'identificazione e la quantificazione dei diversi trascritti di HTLV-2. Sono state analizzate linee cellulari T e B, stabilmente infettate dal virus, in fase esponenziale di crescita. I risultati hanno evidenziato profili di espressione simili per le due linee cellulari T mentre un pattern diverso è stato osservato per la linea cellulare B. L'analisi della cinetica di espressione condotta sulla linea BJAB-Gu ha mostrato un andamento ciclico dell'espressione, mentre per la linea C344 Mo è stato messo in evidenza un progressivo silenziamento dell'espressione genica dopo diversi giorni dalla messa in coltura delle cellule. Lo stesso esperimento condotto su PBMC ottenuti da un paziente italiano infettato da HTLV-2, ha mostrato che il trascritto tax/rex presenta un picco di espressione precoce, e che i trascritti gag/pol e delle proteine accessorie p28,p22/p20-1 e -2 presentano un aumento graduale e tardivo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Ahuja J, Kampani K, Datta S, Wigdahl B, Flaig KE, Jain P. 2006. Use of human antigen presenting cell gene array profiling to examine the effect of human T-cell leukemia virus type 1 Tax on primary human dendritic cells. *J Neurovirol.* 12:47-59.
- Alefantis T, Barmak K, Harhaj EW, Grant C, Wigdahl B. 2003. Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J Biol Chem.* 278:21814-22.
- Alefantis T, Mostoller K, Jain P, Harhaj E, Grant C, Wigdahl B. 2005a. Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *J Biol Chem.* Apr 280:17353-62.
- Alefantis T, Jain P, Ahuja J, Mostoller K, Wigdahl B. 2005b. HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *J Biomed Sci.* 12:961-74.
- Alefantis T, Flaig KE, Wigdahl B, Jain P. 2007. Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomed Pharmacother.* 61:194-200.
- Alexandre C, Charnay P, Verrier B. 1991. Transactivation of Krox-20 and Krox-24 promoters by the HTLV-1 Tax protein through common regulatory elements. *Oncogene.* 6:1851-7.
- Araujo A., Sheehy N., Takahashi H., Hall W. 2002a. Concomitant infections with HIV-1 and HTLV types 1 and 2. Washington, DC: ASM. 75-97.
- Araujo A., Sheehy N., Takahashi H. et al. 2002b. Human retroviruses: concomitant infections with human immunodeficiency virus type I (HIV-I) and human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) and type II (HTLV-II). In: Bogden KA, Guthmuller JM, eds. Polymicrobial infections. Washington, DC: American Society of Microbiology. 75-97.
- Araujo A., Hall W.W. 2004. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol* 56: 10-19.
- Arnold J, Zimmerman B, Li M, Lairmore MD, Green PL. 2008. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood.* 112:3788-97.
- Asquith, B., Mosley, A.J., Heaps, A., Tanaka, Y., Taylor, G.P., McLean, A.R. and Bangham, C.R. 2005. Quantification of the virus-host interaction in human T lymphotropic virus I infection. *Retrovirology* 2, 75.
- Asquith, B., Zhang, Y., Mosley, A.J., de Lara, C.M., Wallace, D.L., Worth, A., Kaftantzi, L., Meekings, K., Griffin, G.E., Tanaka, Y., Tough, D.F., Beverley, P.C., Taylor, G.P., Macallan, D.C. and Bangham, C.R. 2007. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8035-40.

- Awasthi S, Sharma A, Wong K, Zhang J, Matlock EF, Rogers L, Motloch P, Takemoto S, Taguchi H, Cole MD, Lüscher B, Dittrich O, Tagami H, Nakatani Y, McGee M, Girard AM, Gaughan L, Robson CN, Monnat RJ Jr, Harrod R. 2005. A human T-cell lymphotropic virus type 1 enhancer of Myc transforming potential stabilizes Myc-TIP60 transcriptional interactions. *Mol Cell Biol.* 25:6178-98.
- Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology.* 13;1:20.
- Bangham, C.R. 2003a. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): persistence and immune control. *Int J Hematol.* 78:297-303.
- Bangham CR. 2003b. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol.* 84(Pt 12):3177-89.
- Bangham CR, Osame M. 2005. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene.* 24:6035-46.
- Bantignies F, Rousset R, Desbois C, Jalinot P. 1996. Genetic characterization of transactivation of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: Binding of Tax to Tax-responsive element 1 is mediated by the cyclic AMP-responsive members of the CREB/ATF family of transcription factors. *Mol Cell Biol.* 16:2174-82.
- Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahl B. 2003. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology.* 30;308(1):1-12.
- Bartman MT, Kaidarova Z, Hirschhorn D, Sacher RA, Frider J, Garratty G, Gible J, Smith JW, Newman B, Yeo AE, Murphy EL. 2008. HTLV Outcomes Study (HOST) Investigators. Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. *Blood.* 112:3995-4002.
- Basbous J, Bazarbachi A, Granier C, Devaux C, Mesnard JM. 2003. The central region of human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein contains distinct domains involved in subunit dimerization. *J Virol.* 77:13028-35.
- Bassani S, López M, Toro C, Jiménez V, Sempere JM, Soriano V, Benito JM. 2007. Influence of human T cell lymphotropic virus type 2 coinfection on virological and immunological parameters in HIV type 1-infected patients. *Clin Infect Dis.* 44:105-10.
- Baydoun H, Duc-Dodon M, Lebrun S, Gazzolo L, Bex F. 2007. Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins Tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene.* 386:191-201.
- Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS Jr. 1992. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.* 6:1899-913.

- Beilke MA, Traina-Dorge V, England JD, Blanchard JL. 1996. Polymyositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human T lymphotropic virus type I. *Arthritis Rheum.* 39(4):610-5.
- Beilke MA, Theall KP, O'Brien M, Clayton JL, Benjamin SM, Winsor EL, Kissinger PJ. 2004. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis.*39:256-63.
- Beilke MA, Traina-Dorge VL, Sirois M, Bhuiyan A, Murphy EL, Walls JM, Fagan R, Winsor EL, Kissinger PJ. 2007. Relationship between human T lymphotropic virus (HTLV) type 1/2 viral burden and clinical and treatment parameters among patients with HIV type 1 and HTLV-1/2 coinfection. *Clin Infect Dis.* 44:1229-34.
- Berger JR, Raffanti S, Svenningsson A, McCarthy M, Snodgrass S, Resnick L. 1991. The role of HTLV in HIV-1 neurologic disease. *Neurology.* 41:197-202.
- Bex F, McDowall A, Burny A, Gaynor R. 1997. The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J Virol.* 71:3484-97.
- Bex F, Gaynor RB. 1998. Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein. *Methods.* 16:83-94.
- Bhagavati S, Ehrlich G, Kula RW, Kwok S, Sninsky J, Udani V, Poiesz BJ. 1988. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I DNA and antigen in spinal fluid and blood of patients with chronic progressive myelopathy. *N Engl J Med.* 318:1141-7.
- Blattner W.A.1990. Epidemiology of HTLV-1 and associated diseases. *Human Retrovirology: HTLV.* Blattner W.A. (ed). Raven Press: New York pp 251-264.
- Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. 2008. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology.* 14:5-76.
- Brady J, Jeang KT, Duvall J, Khoury G. 1987. Identification of p40x-responsive regulatory sequences within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J Virol.* 61:2175-81.
- Brady J.N. 1996. Biology of HTLV-I: host cell interaction. In: Hollsberg P., Hafler D., editors. *Human T-cell lymphotropic virus type I.* London: John Wiley and Sons:79-112.
- Brites C, Pedroso C, Netto E, Harrington W Jr, Galvão-Castro B, Couto-Fernandez JC, Pedral-Sampaio D, Morgado M, Teixeira R, Badaró R. 1998. Co-Infection by HTLV-I/II is Associated With Increased Viral Load in PBMC of HIV-1 Infected Patients in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2:70-77.
- Brites C, Alencar R, Gusmão R, Pedroso C, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Badaró R. 2001. Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS.* 15:2053-5.

- Burton M, Upadhyaya CD, Maier B, Hope TJ, Semmes OJ. 2000. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *J Virol.* 74:2351-64.
- Calattini S., Chevalier S.A., Duprez R., Bassot S., Froment A., Mahieux R., Gessain A. 2005. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2: 30.
- Cann AJ, Rosenblatt JD, Wachsman W, Shah NP, Chen IS. 1985. Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation. *Nature.* 318:571-4.
- Casoli C., Cimarelli A., Bertazzoni U. 1995. Cellular tropism of human T-cell leukemia virus type II is enlarged to B lymphocytes in patients with high proviral load. *Virology* 206:1126-1128.
- Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. 2007. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. *AIDS Rev.*9:140-9.
- Catovsky D, Greaves MF, Rose M, Galton DA, Goolden AW, McCluskey DR, White JM, Lampert I, Bourikas G, Ireland R, Brownell AI, Bridges JM, Blattner WA, Gallo RC. 1982. Adult T-cell lymphoma-leukaemia in Blacks from the West Indies. *Lancet.* 20;1(8273):639-43.
- Cavanagh MH, Landry S, Audet B, Arpin-André C, Hivin P, Paré ME, Thête J, Wattel E, Marriott SJ, Mesnard JM, Barbeau B. 2006. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology.* 2;3:15.
- Catalan-Soares BC, Carneiro-Proietti AB, Da Fonseca FG, Correa-Oliveira R, Peralva-Lima D, Portela R, Ribas JG, Gonçalves DU. 2009. Interdisciplinary HTLV Research Group (GIPH), Proietti FA. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. *Med Microbiol Immunol.* 198:1-3.
- Chen IS, Cann AJ, Shah NP, Gaynor RB. 1985. Functional relation between HTLV-II x and adenovirus E1A proteins in transcriptional activation. *Science.* 230:570-3.
- Chevalier SA, Meertens L, Calattini S, Gessain A, Kiemer L, Mahieux R. 2005. Presence of a functional but dispensable nuclear export signal in the HTLV-2 Tax protein. *Retrovirology.* 14:2-70.
- Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C. 2004. Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol.* 78:11823-32.
- Chieco-Bianchi L, Saggioro D, Del Mistro A, Montaldo A, Majone F, Levis AG. 1988. Chromosome damage induced in cord blood T-lymphocytes infected in vitro by HTLV-I. *Leukemia.* 2:223S-232S.

- Chlichlia K, Moldenhauer G, Daniel PT, Busslinger M, Gazzolo L, Schirmacher V, Khazaie K. 1995. Immediate effects of reversible HTLV-1 tax function: T-cell activation and apoptosis. *Oncogene*. 10:269-77.
- Chu ZL, DiDonato JA, Hawiger J, Ballard DW. 1998. The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates IkappaB kinases containing IKKalpha and IKKbeta. *J Biol Chem*. 273:15891-4.
- Ciminale V, Pavlakakis GN, Derse D, Cunningham CP, Felber BK. 1992. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *J Virol*. 66:1737-45.
- Ciminale V, D'Agostino DM, Zotti L, Franchini G, Felber BK, Chieco-Bianchi L. 1995. Expression and characterization of proteins produced by mRNAs spliced into the X region of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type II. *Virology*. 209:445-56.
- Ciminale V, Zotti L, D'Agostino DM, Chieco-Bianchi L. 1997. Inhibition of human T-cell leukemia virus type 2 Rex function by truncated forms of Rex encoded in alternatively spliced mRNAs. *J Virol*. 71:2810-8.
- Ciminale V, Zotti L, D'Agostino DM, Ferro T, Casareto L, Franchini G, Bernardi P, Chieco-Bianchi L. 1999. Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Oncogene*. 18:4505-14.
- Clerc I, Polakowski N, André-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard JM, Lemasson I. 2008. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem*. 283:23903-13.
- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. 1997. *Retroviruses at the National Center for Biotechnology Information*.
- Cowan EP, Alexander RK, Daniel S, Kashanchi F, Brady JN. 1997. Induction of tumor necrosis factor alpha in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *J Virol*. 71:6982-9.
- Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F, Leonard WJ. 1987. Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. *Cell*. 49:47-56.
- Cruikshank E. K. 1956. A Neuropathic Syndrome of Uncertain Origin, Review of 100 Cases. *West Indian Medical Journal*, 5: 147-158.
- D'Agostino DM, Silic-Benussi M, Hilaragi H, Lairmore MD, Ciminale V. 2005. The human T-cell leukemia virus type 1 p13II protein: effects on mitochondrial function and cell growth. *Cell Death Differ*. 12 Suppl 1:905-15.

- de La Fuente C, Deng L, Santiago F, Arce L, Wang L, Kashanchi F. 2000. Gene expression array of HTLV type 1-infected T cells: Up-regulation of transcription factors and cell cycle genes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16:1695-700.
- de la Fuente C, Gupta MV, Klase Z, Strouss K, Cahan P, McCaffery T, Galante A, Soteropoulos P, Pumfery A, Fujii M, Kashanchi F. 2006. Involvement of HTLV-I Tax and CREB in aneuploidy: a bioinformatics approach. *Retrovirology*. 5;3:43.
- Dejardin E. 2006. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*. 72:1161-1179.
- Derse D, Mikovits J, Ruscetti F. 1997. X-I and X-II open reading frames of HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-cells in vitro. *Virology*. 237:123-8.
- de Thé G, Kazanji M. 1996. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*.;13 Suppl 1:S191-8.
- Dhib-Jalbut S, Hoffman PM, Yamabe T, Sun D, Xia J, Eisenberg H, Bergey G, Ruscetti FW. 1994. Extracellular human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein induces cytokine production in adult human microglial cells. *Ann Neurol*. 36:787-90.
- Ding W, Albrecht B, Luo R, Zhang W, Stanley JR, Newbound GC, Lairmore MD. 2001. Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12(I): association with calreticulin and calnexin. *J Virol*. 75:7672-82.
- Ding W, Kim SJ, Nair AM, Michael B, Boris-Lawrie K, Tripp A, Feuer G, Lairmore MD. 2003. Human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I enhances interleukin-2 production during T-cell activation. *J Virol*. 77:11027-39.
- Doi K, Wu X, Taniguchi Y, Yasunaga J, Satou Y, Okayama A, Nosaka K, Matsuoka M. 2005. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood*. 106:1048-53.
- Dooneief G, Marlink R, Bell K, Marder K, Renjifo B, Stern Y, Mayeux R. 1996. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology*. 46:1556-60.
- Eguchi K, Nakamura T, Mine M, Ida H, Kawakami A, Migita K, Nagasato K, Kurata A, Fukuda T, Nagataki S. 1992. HTLV-I associated arthritis: characteristics of an HTLV-I virus infected T cell line from synovial fluid. *Ann Rheum Dis*. 51:673-7.
- Eguchi K, Origuchi T, Takashima H, Iwata K, Katamine S, Nagataki S. 1996. High seroprevalence of anti-HTLV-I antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 39:463-6.
- Ehrlich GD, Poiesz BJ. 1988. Clinical and molecular parameters of HTLV-I infection. *Clin Lab Med*. 8(1):65-84.

- Eiraku N, Novoa P, da Costa Ferreira M, Monken C, Ishak R, da Costa Ferreira O, Zhu SW, Lorenzo R, Ishak M, Azvedo V, Guerreiro J, de Oliveira MP, Loureiro P, Hammerschlag N, Ijichi S, Hall WM. 1996. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol.* Mar;70(3):1481-92.
- Eiraku N, Hingorani R, Ijichi S, Machigashira K, Gregersen PK, Monteiro J, Usuku K, Yashiki S, Sonoda S, Osame M, Hall WW. 1998. Clonal expansion within CD4+ and CD8+ T cell subsets in human T lymphotropic virus type I-infected individuals. *J Immunol.* 161:6674-80.
- Ejima E, Rosenblatt JD, Massari M, Quan E, Stephens D, Rosen CA, Prager D. 1993. Cell-type-specific transactivation of the parathyroid hormone-related protein gene promoter by the human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) tax and HTLV-II tax proteins. *Blood.* 81:1017-24.
- Elovaara I, Koenig S, Brewah AY, Woods RM, Lehky T, Jacobson S. 1993. High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med.* 177:1567-73.
- Endo K, Hirata A, Iwai K, Sakurai M, Fukushi M, Oie M, Higuchi M, Hall WW, Gejyo F, Fujii M. 2002. Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than HTLV-1 Tax. *J Virol.* 76:2648-53.
- Escoffier E, Rezza A, Roborel de Climens A, Belleville A, Gazzolo L, Gilson E, Duc Dodon M. 2005. A balanced transcription between telomerase and the telomeric DNA-binding proteins TRF1, TRF2 and Pot1 in resting, activated, HTLV-1-transformed and Tax-expressing human T lymphocytes. *Retrovirology.* 15:2-77.
- Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge ML, Damas CD, Segurado AA. 2001. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 26(2):185-90.
- Fanning AS, Anderson JM. 1999. Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol.* 11:432-9.
- Feigal E, Murphy E, Vranizan K, Bacchetti P, Chaisson R, Drummond JE, Blattner W, McGrath M, Greenspan J, Moss A. 1991. Human T cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: risk factors associated with seropositivity. *J Infect Dis.* 164(1):36-42.
- Felber BK, Paskalis H, Kleinman-Ewing C, Wong-Staal F, Pavlakis GN. 1985. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science.* 229:675-9.
- Ferreira OC Jr, Planelles V, Rosenblatt JD. 1997. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Rev.* 11(2):91-104.

- Feuer G., Green P.L. 2005. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24: 5996-6004.
- Fouchard N., Mahe A., Huerre M., Fraitag S., Valensi F., Macintyre E., Sanou F., de The G., Gessain A. 1998. Cutaneous T cell lymphomas: mycosis fungoides, Sezary syndrome and HTLV-I-associated adult T cell leukemia (ATL) in Mali, West Africa: a clinical, pathological and immunovirological study of 14 cases and a review of the African ATL cases. *Leucemia* 12 578-585.
- Franchini G, Tartaglia J, Markham P, Benson J, Fullen J, Wills M, Arp J, Dekaban G, Paoletti E, Gallo RC. 1995. Highly attenuated HTLV type I env poxvirus vaccines induce protection against a cell-associated HTLV type I challenge in rabbits. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11:307-13.
- Freitas V, Gomes I, Bittencourt A, Fernandes D, Melo A. 1997. Adult T-cell leukemia-lymphoma in a patient with HTLV-I/II associated myelopathy. *Arq Neuropsiquiatr*. 55:325-8.
- Fu DX, Kuo YL, Liu BY, Jeang KT, Giam CZ. 2003. Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 278:1487-93.
- Fujii M, Niki T, Mori T, Matsuda T, Matsui M, Nomura N, Seiki M. 1991. HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene*. 6:1023-9.
- Fujii M, Iwai K, Oie M, Fukushi M, Yamamoto N, Kannagi M, Mori N. 2000. Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16:1603-6.
- Fujimoto T, Hata T, Itoyama T, Nakamura H, Tsukasaki K, Yamada Y, Ikeda S, Sadamori N, Tomonaga M. 1999. High rate of chromosomal abnormalities in HTLV-I-infected T-cell colonies derived from prodromal phase of adult T-cell leukemia: a study of IL-2-stimulated colony formation in methylcellulose. *Cancer Genet Cytogenet*. 109:1-13.
- Fujino T, Iwamoto I, Otsuka H, Ikeda T, Takesako S, Nagata Y. 1999. Apoptosis in placentas from human T-lymphotropic virus type I-seropositive pregnant women: a possible defense mechanism against transmission from mother to fetus. *Obstet Gynecol*. 94(2):279-83.
- Fujino T, Nagata Y. 2000. HTLV-I transmission from mother to child. *J Reprod Immunol*. 47(2):197-206.
- Fujisawa J, Seiki M, Kiyokawa T, Yoshida M. 1985. Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:2277-81.

- Fujiyoshi T, Yashiki S, Fujiyama C, Kuwayama M, Miyashita H, Ohnishi H, Blank M, Zaninovic V, Blank A, Cartier L, et al. 1995. Ethnic segregation of HTLV-I and HTLV-II carriers among South American native Indians. *Int J Cancer*. 63(4):510-5.
- Gabet AS, Mortreux F, Talarmin A, Plumelle Y, Leclercq I, Leroy A, Gessain A, Clity E, Joubert M, Wattel E. 2000. High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene*. 12;19(43):4954-60.
- Gallo RC. 2005. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*. 24:5926-30.
- Gatza ML, Watt JC, Marriott SJ. 2003. Cellular transformation by the HTLV-I Tax protein, a jack-of-all-trades. *Oncogene*. 22:5141-9.
- Gatza ML, Marriott SJ. 2006. Genotoxic stress and cellular stress alter the subcellular distribution of human T-cell leukemia virus type 1 tax through a CRM1-dependent mechanism. *J Virol*. 80:6657-68.
- Gatza ML, Dayaram T, Marriott SJ. . 2007. Ubiquitination of HTLV-I Tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and nuclear export. *Retrovirology* 14;4:95.
- Gerard Y., Lepere J.F., Pradinaud R., Joly F., Lepelletier L., Joubert M., Sainte Marie D., Mahieux R., Vidal A.U., Larregain-Fournier D. 1995. Clustering and clinical diversity of adult T-cell leukemia/lymphoma associated with HTLV-I in a remote black population of French Guiana. *Int. J. Cancer*. 60:773-776.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 24;2(8452):407-10.
- Gessain A, Caudie C, Gout O, Vernant JC, Maurs L, Giordano C, Malone G, Tournier-Lasserre E, Essex M, de-Thé G. 1988. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 157:1226-34.
- Gessain A, Yanagihara R, Franchini G, Garruto RM, Jenkins CL, Ajdukiewicz AB, Gallo RC, Gajdusek DC. 1991. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A* . 88:7694-7698.
- Gessain A, Gout O. 1992. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med*. 117:933-46.
- Giam CZ, Xu YL. 1989. HTLV-I tax gene product activates transcription via pre-existing cellular factors and cAMP responsive element. *J Biol Chem*. 264:15236-41.

- Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, Hanchard B, LaGrenade L, Cranston B, Hendriks J, Jaffe ES, Saxinger C, Robert-Guroff M, et al. 1987. Non-Hodgkin lymphoma in Jamaica and its relation to adult T-cell leukemia-lymphoma. *Ann Intern Med.* 106(3):361-8. Erratum in: *Ann Intern Med* 1987 Jun;106(6):917.
- Gitlin SD, Lindholm PF, Marriott SJ, Brady JN. 1991. Transdominant human T-cell lymphotropic virus type I TAX1 mutant that fails to localize to the nucleus. *J Virol.* 65:2612-21.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 363:15-23.
- Gonçalves DU, Guedes AC, Carneiro-Proietti AB, Pinheiro SR, Catalan-Soares B, Proietti FA, Lambertucci JR. 1999. Simultaneous occurrence of HTLV-I associated myelopathy, uveitis and smouldering adult T cell leukaemia. GIPH (Interdisciplinary HTLV-I/II Research Group). *Int J STD AIDS.* 10:336-7.
- Goubau P, Desmyter J, Ghesquiere J, Kasereka B. 1992. HTLV-II among pygmies. *Nature.* 17:359-201.
- Gout O, Baulac M, Gessain A, Semah F, Saal F, Périès J, Cabrol C, Foucault-Fretz C, Laplane D, Sigaux F, et al. 1990. Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac transplantation. *N Engl J Med.* 322:383-8.
- Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. 2002. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol.* 190:133-59.
- Green, P.L., Ross, T.M., Chen, I.S. and Pettiford, S. 1995. Human T-cell leukemia virus type II nucleotide sequences between env and the last exon of tax/rex are not required for viral replication or cellular transformation. *J Virol* 69, 387-94.
- Greten TF, Slansky JE, Kubota R, Soldan SS, Jaffee EM, Leist TP, Pardoll DM, Jacobson S, Schneck JP. 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7568-73.
- Hai T, Hartman MG. 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene.* 273:1-11.
- Hakoda E, Machida H, Tanaka Y, Morishita N, Sawada T, Shida H, Hoshino H, Miyoshi I. 1995. Vaccination of rabbits with recombinant vaccinia virus carrying the envelope gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 60:567-70.
- Haller K, Wu Y, Derow E, Schmitt I, Jeang KT, Grassmann R. 2002. Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 22:3327-38.

- Hanchard B, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, Williams E, Williams N, Jaffe ES, Cranston B, Panchooshingh LD, LaGrenade L, Wilks RJ, Murphy EL, Blattner WA, Manns A. 1990. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Jamaica. In: Blattner WA , editor. Human retrovirology: HTLV. New York: Raven. pp. 173-183.
- Hanchard B. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Jamaica: 1986-1995. 1996. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1:S20-5.
- Haoudi A, Daniels RC, Wong E, Kupfer G, Semmes OJ. 2003. Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *J Biol Chem.* 278:37736-44.
- Haoudi A, Semmes OJ. 2003. The HTLV-1 tax oncoprotein attenuates DNA damage induced G1 arrest and enhances apoptosis in p53 null cells. *Virology.* 305:229-39.
- Harhaj EW, Sun SC. 1999. IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem.* 274:22911-4.
- Harhaj EW, Good L, Xiao G, Sun SC. Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene.* 1999 18:1341-9.
- Harhaj NS., Sun SC e Harhaj EW. 2007. Activation of NF-kappa B by the human T cell leukemia virus type I Tax oncoprotein is associated with ubiquitin-dependent relocalization of I kappa B kinase. *J Biol Chem* 282:4185-92.
- Harper JV, Brooks G. 2005. The mammalian cell cycle: an overview. *Methods Mol Biol.* 296:113-53.
- Harrington WJ Jr, Sheremata W, Hjelle B, Dube DK, Bradshaw P, Fong SK, Snodgrass S, Toedter G, Cabral L, Poesz B. 1993. Spastic ataxia associated with human T-cell lymphotropic virus type II infection. *Ann Neurol.* 33:411-4.
- Harris BZ, Lim WA. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci.* 114:3219-31.
- Harrod R, Kuo YL, Tang Y, Yao Y, Vassilev A, Nakatani Y, Giam CZ. 2000. p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J Biol Chem.* 275:11852-7.
- Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. 2006. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med.* 12:466-72.
- Hay RT. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell.* 18:1-12.

- Hayami M, Ohta Y, Hattori T, Nakamura H, Takatsuki K, Kashiwa A, Nozawa K, Miyoshi I, Ishida T, Tanioka Y, et al. 1985. Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type III in various non-human primates. *Jpn J Exp Med.* 55:251-5.
- Hayashi J, Kishihara Y, Yoshimura E, Furusyo N, Yamaji K, Kawakami Y, Murakami H, Kashiwagi S. 1997. Correlation between human T cell lymphotropic virus type-1 and *Strongyloides stercoralis* infections and serum immunoglobulin E responses in residents of Okinawa, Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 56:71-5.
- Hidaka M, Inoue J, Yoshida M, Seiki M. 1988. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* 7:519-23.
- Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M. 2007. Cooperation of NF-kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line. *J Virol.* 81:11900-7.
- Hino S, Katamine S, Miyata H, Tsuji Y, Yamabe T, Miyamoto T. 1997. Primary prevention of HTLV-1 in Japan. *Leukemia.* 11 Suppl 3:57-9.
- Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I. 1981. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(10):6476-80.
- Hirai H, Suzuki T, Fujisawa J, Inoue J, Yoshida M. 1994. Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor kappa B and induces nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B proteins for transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 26;91(9):3584-8.
- Hiraragi H, Kim SJ, Phipps AJ, Silic-Benussi M, Ciminale V, Ratner L, Green PL, Lairmore MD. 2006. Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13(II) is required for viral infectivity in vivo. *J Virol.* 80:3469-76.
- Hisada M, Miley WJ, Biggar RJ. 2005. Provirus load is lower in human T lymphotropic virus (HTLV)-II carriers than in HTLV-I carriers: a key difference in viral pathogenesis? *J Infect Dis.* 191:1383-5; author reply 1385-6.
- Hivin P, Basbous J, Raymond F, Henaff D, Arpin-André C, Robert-Hebmann V, Barbeau B, Mesnard JM. 2007. The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology.* 16;4:14.
- Höllsberg P, Ausubel LJ, Hafler DA. 1994. Human T cell lymphotropic virus type I-induced T cell activation. Resistance to TGF-beta 1-induced suppression. *J Immunol.* 153:566-73.
- Hong S, Wang LC, Gao X, Kuo YL, Liu B, Merling R, Kung HJ, Shih HM, Giam CZ. 2007. Heptad repeats regulate protein phosphatase 2a recruitment to I-kappaB kinase

gamma/NF-kappaB essential modulator and are targeted by human T-lymphotropic virus type 1 tax. *J Biol Chem.* 282:12119-26.

Hjelle B, Appenzeller O, Mills R, Alexander S, Torrez-Martinez N, Jahnke R, Ross G. 1992. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet.* 339:645-6.

Hung AY, Sheng M. 2002. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem.* 277:5699-702.

Hutten S, Kehlenbach RH. 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 17:193-201.

Iannone R., Sherman M.P., Rodgers-Johnson P.E., Beilke M.A., Mora C.A., Amin R.M., Tinsley S.R., Papsidero L.D., Poiesz B.J., Gibbs C.J.Jr. 1992. HTLV-I DNA sequences in CNS tissue of a patient with tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *J. Acq. Immun. Def. Synd.* 5:810-6.

Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR. 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science.* 299:1713-6.

Iha H, Kasai T, Kibler KV, Iwanaga Y, Tsurugi K, Jeang KT. 2000. Pleiotropic effects of HTLV type 1 Tax protein on cellular metabolism: mitotic checkpoint abrogation and NF-kappaB activation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:1633-8.

Ijichi S, Matsuda T, Maruyama I, Izumihara T, Kojima K, Niimura T, Maruyama Y, Sonoda S, Yoshida A, Osame M. 1990. Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier. *Ann Rheum Dis.* 49:718-21.

Ijichi S, Ramundo MB, Takahashi H, Hall WW. 1992. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). *J Exp Med.* 176:293-6.

Ina Y, Gojobori T. 1990. Molecular evolution of human T-cell leukemia virus. *J Mol Evol.* 31:493-9.

Inose M., Higuchi I., Yoshimine K., Suehara M., Izumo S., Arimura K., Osame M. 1992. Pathological changes in skeletal muscle in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 110:73-78.

Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S, Yoshida M. 1986. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J.* 5:2883-8.

Inoue J, Yoshida M, Seiki M. 1987. Transcriptional (p40x) and post-transcriptional (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:3653-7.

Ishihara S, Okayama A, Stuver S, Horinouchi H, Shioiri S, Murai K, Kubota T, Yamashita R, Tachibana N, Tsubouchi H, et al. 1994. Association of HTLV-I antibody

profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 7:199-203.

Ishikawa T. Current status of therapeutic approaches to adult T-cell leukemia. *Int J Hematol.* 2003 Nov;78(4):304-11.

Ishitsuka K, Suzumiya J, Aoki M, Ogata K, Hara S, Tamura K. 2007. Therapeutic potential of arsenic trioxide with or without interferon-alpha for relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma. *Haematologica.* 92:719-20.

Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, Takiguchi M, Sato K, Kitajima I, Nishioka K, Yamamoto K, Takeda T, Hatanaka M, et al. 1991. Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science.* 253:1026-8.

Iwasaki Y. 1990. Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP). *J Neurol Sci.* 96:103-23.

Jacobson S, Raine CS, Mingioli ES, McFarlin DE. 1988a. Isolation of an HTLV-1-like retrovirus from patients with tropical spastic paraparesis. *Nature.* 331:540-3.

Jacobson S, Zaninovic V, Mora C, Rodgers-Johnson P, Sheremata WA, Gibbs CJ Jr, Gajdusek C, McFarlin DE. 1988b. Immunological findings in neurological diseases associated with antibodies to HTLV-I: activated lymphocytes in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol.* 23 Suppl:S196-200.

Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. 1990. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348:245-8.

Jacobson S, McFarlin DE, Robinson S, Voskuhl R, Martin R, Brewah A, Newell AJ, Koenig S. 1992. HTLV-I-specific cytotoxic T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated neurological disease. *Ann Neurol.* 32:651-7.

Jacobson S. 2002. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *J Infect Dis.* 186 Suppl 2:S187-92.

Jain P, Mostoller K, Flaig KE, Ahuja J, Lepoutre V, Alefantis T, Khan ZK, Wigdahl B. 2007. Identification of human T cell leukemia virus type 1 tax amino acid signals and cellular factors involved in secretion of the viral oncoprotein. *J Biol Chem.* 282:34581-93.

Jeang KT, Boros I, Brady J, Radonovich M, Khoury G. 1988. Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40x-responsive 21-base-pair sequence. *J Virol.* 62:4499-509.

Jeang KT. 2001. Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:207-17.

- Jeang KT, Giam CZ, Majone F, Aboud M. 2004. Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. *J Biol Chem.* 279:31991-4.
- Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CR. 1999. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3848-53.
- Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CR. 2000. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol.* 165:7278-84.
- Jin DY, Jeang KT. 1997. HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res.* 25:379-87.
- Jin DY, Giordano V, Kibler KV, Nakano H, Jeang KT. 1999. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *J Biol Chem.* 274:17402-5.
- Jin Q, Agrawal L, VanHorn-Ali Z, Alkhatib G. 2006. Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. *Virology.* 349:184-96.
- Johnson JM, Mulloy JC, Ciminale V, Fullen J, Nicot C, Franchini G. 2000. The MHC class I heavy chain is a common target of the small proteins encoded by the 3' end of HTLV type 1 and HTLV type 2. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:1777-81.
- Johnson JM, Nicot C, Fullen J, Ciminale V, Casareto L, Mulloy JC, Jacobson S, Franchini G. 2001. Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *J Virol.* 75:6086-94.
- Jones KS, Fugo K, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Lisinski I, Cushman SW, Jacobson S, Ruscetti FW. 2006. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol.* 80:8291-302.
- Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. 1986. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis.* 154(5):851-7.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 1982 218:571-3.
- Kalyanaraman V.S., Narayanan R., Feorino P., Ramsey R.B., Palmer E.L., Chorba T. et al. 1985. Isolation and characterization of a human T cell Leucemia virus type II from a hemophilia-A patient with pancytopenia. *EMBO J.* 4: 1455-1460.

- Kanno T, Brown K, Franzoso G, Siebenlist U. 1994. Kinetic analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* 14:6443-51.
- Kao SY, Lemoine FJ, Marriott SJ. 2000. Suppression of DNA repair by human T cell leukemia virus type 1 Tax is rescued by a functional p53 signaling pathway. *J Biol Chem.* 275:35926-31.
- Karin M, Ben-Neriah Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.*;18:621-63.
- Karin M, Lin A. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 3:221-7.
- Kasahata N, Kawamura M, Shiota J, Miyazawa Y, Suzuki Y, Sugita K. 2000. A case of acute type adult T cell leukemia and human T-lymphotropic virus type I associated myelopathy who presented meningitis and polyradiculoneuropathy and improved with steroid treatment. *No To Shinkei.* 52:1003-6.
- Kashanchi F, Brady JN. 2005. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene.* 24:5938-51.
- Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, Zago MA, Covas DT. 2006. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 22:953-9.
- Kawai H, Nishida Y, Takagi M, Nakamura S, Saito S. 1989. HTLV-I associated myelopathy (HAM) with adult T-cell leukemia (ATL) *Rinsho Shinkeigaku.* 29:588-92.
- Kawai H., Inui T., Kashiwagi S., Tsuchihashi T., Masuda K., Kondo A., Niki S., Iwasa M., Saito S. 1992. HTLV-I infection in patients with autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis). *J. Med. Virol.* 39:138-141.
- Kazanji M, Moreau JP, Mahieux R, Bonnemains B, Bomford R, Gessain A, de Thé G. 1997. HTLV-I infection in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) using autologous, homologous, or heterologous HTLV-I-transformed cell lines. *Virology.* 231:258-66.
- Kazanji M, Heraud JM, Merien F, Pique C, de Thé G, Gessain A, Jacobson S. 2006. Chimeric peptide vaccine composed of B- and T-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 induces humoral and cellular immune responses and reduces the proviral load in immunized squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Gen Virol.* 87(Pt 5):1331-7.
- Kchour G, Makhoul NJ, Mahmoudi M, Kooshyar MM, Shirdel A, Rastin M, Rafatpanah H, Tarhini M, Zalloua PA, Hermine O, Farid R, Bazarbachi A. 2007. Zidovudine and interferon-alpha treatment induces a high response rate and reduces HTLV-1 proviral load and VEGF plasma levels in patients with adult T-cell leukemia from North East Iran. *Leuk Lymphoma.* Feb;48(2):330-6.
- Khabbaz RF, Hartel D, Lairmore M, Horsburgh CR, Schoenbaum EE, Roberts B, Hartley TM, Friedland G. 1991. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II)

infection in a cohort of New York intravenous drug users: an old infection? *J Infect Dis.* 163:252-6.

Khabbaz RF, Onorato IM, Cannon RO, Hartley TM, Roberts B, Hosein B, Kaplan JE. 1992. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. *N Engl J Med.* 6;326(6):375-80.

Kim SJ, Nair AM, Fernandez S, Mathes L, Lairmore MD. 2006. Enhancement of LFA-1-mediated T cell adhesion by human T lymphotropic virus type 1 p12I1. *J Immunol.* 176:5463-70.

Kimura I. 1992. HABA (HTLV-I associated bronchiolo-alveolar disorder). *Nihon. Kyobu. Shikkam Gakkai. Zasshi* 30:787-795.

Kinoshita K, Hino S, Amagaski T, Ikeda S, Yamada Y, Suzuyama J, Momita S, Toriya K, Kamihira S, Ichimaru M. 1984. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *Gann.* 75(2):103-5.

Koga H, Imada K, Ueda M, Hishizawa M, Uchiyama T. 2004. Identification of differentially expressed molecules in adult T-cell leukemia cells proliferating in vivo. *Cancer Sci.* 95:411-7.

Koralnik IJ, Boeri E, Saxinger WC, Monico AL, Fullen J, Gessain A, Guo HG, Gallo RC, Markham P, Kalyanaraman V, et al. 1994. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol.* Apr;68(4):2693-707.

Koralnik IJ, Mulloy JC, Andresson T, Fullen J, Franchini G. 1995. Mapping of the intermolecular association of human T cell leukaemia/lymphotropic virus type I p12I and the vacuolar H⁺-ATPase 16 kDa subunit protein. *J Gen Virol.* 76 (Pt 8):1909-16.

Koralnik IJ. 1996. Structure of HTLV-I. In: Hollsberg P., Hafler D., editors. *Human T-cell lymphotropic virus type I*. New York: John Wiley and Sons Ltd:65-78.

Koyanagi Y., Itoyama Y., Nakamura N., Takamatsu K., Kira J.I., Iwamasa T., Goto I., Yamamoto N. 1993. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196:25-33.

Kubota S, Hatanaka M, Pomerantz RJ. 1996. Nucleo-cytoplasmic redistribution of the HTLV-I Rex protein: alterations by coexpression of the HTLV-I p21x protein. *Virology.* 220:502-7.

Kubota R, Nagai M, Kawanishi T, Osame M, Jacobson S. 2000. Increased HTLV type 1 tax specific CD8⁺ cells in HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:1705-9.

Kubota R, Soldan SS, Martin R, Jacobson S. 2002. Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. *J Neurovirol.* 8:53-7.

- Kuhlmann AS, Villaudy J, Gazzolo L, Castellazzi M, Mesnard JM, Duc Dodon M. 2007. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology*. 13;4:92.
- La Grenade L. 1996. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 13 (Suppl 1):S46-9.
- LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. Dec 1;336(8727):1345-7.
- Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Brasseur R, Burny A, Gaynor RB, Bex F. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol*. 25:10391-406.
- Larocca D, Chao LA, Seto MH, Brunck TK. 1989. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 163:1006-13.
- Larsen O, Andersson S, da Silva Z, Hedegaard K, Sandström A, Naclér A, Dias F, Melbye M, Aaby P. 2000. Prevalences of HTLV-1 infection and associated risk determinants in an urban population in Guinea-Bissau, West Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Oct 1;25(2):157-63.
- Laurentino RV, Lopes IG, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L, Ishak MO, Ishak R, Vallinoto AC. 2005. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100:371-6.
- Lee TH, Coligan JE, Homma T, McLane MF, Tachibana N, Essex M. 1984. Human T-cell leukemia virus-associated membrane antigens: identity of the major antigens recognized after virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:3856-60.
- Lee H, Swanson P, Shorty VS, Zack JA, Rosenblatt JD, Chen IS. 1989. High rate of HTLV-II infection in seropositive i.v. drug abusers in New Orleans. *Science* 28;244(4903):471-5.
- Lee HH, Weiss SH, Brown LS, Mildvan D, Shorty V, Saravolatz L, Chu A, Ginzburg HM, Markowitz N, Des Jarlais DC, et al. 1990. Patterns of HIV-1 and HTLV-I/II in intravenous drug abusers from the middle atlantic and central regions of the USA. *J Infect Dis*. 162(2):347-352.
- Lehky TJ, Fox CH, Koenig S, Levin MC, Flerlage N, Izumo S, Sato E, Raine CS, Osame M, Jacobson S. 1995. Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann Neurol*. Feb 37:167-75.
- Lemoine FJ, Marriott SJ. 2001. Accelerated G(1) phase progression induced by the human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) Tax oncoprotein. *J Biol Chem*. 276:31851-7.

- Leung K, Nabel GJ. 1988. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF-kappa B-like factor. *Nature* 333:776-8.
- Lewis MJ, Sheehy N, Salemi M, VanDamme AM, Hall WW. 2002. Comparison of CREB- and NF-kappaB-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) tax proteins. *Virology*. 295:182-9.
- Li Q, Verma IM. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2:725-34.
- Li M, Green PL. 2007. Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 142:159-68.
- Li M, Kesic M, Yin H, Yu L, Green PL. 2009. Kinetic Analysis of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Gene Expression in Cell Culture and Infected Animals. *J Virol*. Feb 4 [Epub ahead of print].
- Liang MH, Geisbert T, Yao Y, Hinrichs SH, Giam CZ. 2002. Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes S-phase entry but blocks mitosis. *J Virol*. 76:4022-33.
- Lindholm PF, Marriott SJ, Gitlin SD, Bohan CA, Brady JN. 1990. Induction of nuclear NF-kappa B DNA binding activity after exposure of lymphoid cells to soluble tax1 protein. *New Biol*. 2:1034-43.
- Liu H, Leung P, Glynn S, Murphy EL. 2001. Human T-lymphotropic virus type II RFLP subtypes a0 and b4/b5 are associated with different demographic and geographic characteristics in the United States. *Virology*. Jan 5;279(1):90-6.
- Los M, Khazaie K, Schulze-Osthoff K, Baeuerle PA, Schirmacher V, Chlichlia K. Human T cell leukemia virus-I (HTLV-I) Tax-mediated apoptosis in activated T cells requires an enhanced intracellular prooxidant state. *J Immunol*. 1998 161:3050-5.
- Low KG, Dorner LF, Fernando DB, Grossman J, Jeang KT, Comb MJ. 1997. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax releases cell cycle arrest induced by p16INK4a. *J Virol*. 71:1956-62.
- Lowis GW, Sheremata WA, Minagar A. 2002. Epidemiologic features of HTLV-II: serologic and molecular evidence. *Ann Epidemiol*. 12:46-66.
- Lynch MP, Kaumaya PT. 2006. Advances in HTLV-1 peptide vaccines and therapeutics. *Curr Protein Pept Sci*. 7:137-45.
- Machuca A, Rodés B, Soriano V. 2001. The effect of antiretroviral therapy on HTLV infection. *Virus Res*. 78:93-100.
- Majone F, Jeang KT. 2000. Clastogenic effect of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein correlates with unstabilized DNA breaks. *J Biol Chem*. 275:32906-10.
- Maloney EM, Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Cranston B, Hanchard B, Holding-Cobham M, Malley K, Blattner WA. 1991. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-

I) seroprevalence in Jamaica. II. Geographic and ecologic determinants. *Am J Epidemiol.* 1;133(11):1125-34.

Maloney EM, Cleghorn FR, Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Cranston B, Jack N, Blattner WA, Bartholomew C, Manns A. Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 17:167-70.

Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell.* 115:449-59.

Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, Hanchard B, Blattner WA. 1992. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer.* 30;51(6):886-91.

Manns A, Hisada M, La Grenade L. 1999. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet.* 5;353(9168):1951-8.

Mansky LM. 2000. In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J Virol.* 74:9525-31.

Marriott SJ, Lindholm PF, Reid RL, Brady JN. 1991. Soluble HTLV-I Tax1 protein stimulates proliferation of human peripheral blood lymphocytes. *New Biol.* 3:678-86.

Marriott SJ, Semmes OJ. 2005. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene.* 24:5986-95.

Marsh B.J. 1996. Infectious complications of human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection. *Clinical infectious diseases.* 23:138-45.

Maruyama M, Shibuya H, Harada H, Hatakeyama M, Seiki M, Fujita T, Inoue J, Yoshida M, Taniguchi T. 1987. Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell.* 48:343-50.

Matutes E., Schulz T., Serpa M.J., de Queiroz-Campos-Araujo A., de Oliveira M.S. 1994. Report of the second international symposium on HTLV in Brazil. *Leucemia* 8:1092-1094.

Matsuoka M. 2003. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene.* 22:5131-40.

Matsuoka M, Jeang KT. 2005. Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. *Cancer Res.* 65:4467-70.

Matsuoka M, Jeang KT. 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* 7:270-80.

McKhann II G, Gibbs CJ Jr., Mora CA, Rodgers-Johnson PE, Liberski PP, Gdula WJ, et al. 1989. Isolation and characterization of HTLV-1 from symptomatic family members

- with tropical spastic paraparesis (HTLV-1 encephalomyeloneuropathy). *J Infect Dis.* 160:371-9
- Menten P, Wuyts A, Van Damme J. 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:455-81.
- Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, Mahieux R. 2004a. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J Biol Chem.* 279:43307-20.
- Meertens L, Pise-Masison C, Quere N, Brady J, Gessain A, Mahieux R. 2004b. Utilization of the CBP but not the p300 co-activator by human T-lymphotropic virus type-2 Tax for p53 inhibition. *Oncogene.* 23:5447-58.
- Mesnard JM, Barbeau B, Devaux C. 2006. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. *Blood.* 108:3979-82.
- Miller GJ, Pegram SM, Kirkwood BR, Beckles GL, Byam NT, Clayden SA, Kinlen LJ, Chan LC, Carson DC, Greaves MF. 1986. Ethnic composition, age and sex, together with location and standard of housing as determinants of HTLV-I infection in an urban Trinidadian community. *Int J Cancer.* 15;38(6):801-8.
- Miyake H, Suzuki T, Hirai H, Yoshida M. 1999. Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology.* 253:155-61.
- Miyoshi I, Kubonishi I, Sumida M, Hiraki S, Tsubota T, Kimura I, Miyamoto K, Sato J. 1980. A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann.* 71(1): 155-6.
- Miyoshi I, Miyamoto K, Sumida M, Nishihara R, Lai M, Yoshimoto S, Sato J, Kimura I. 1981. Chromosome 14q+ in adult T-cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 3(3):251-9.
- Mochizuki M., Watanabe T., Yamaguchi K., Tajima K., Yoshimura K., Nakashima S., Shirao M., Araki S., Miyata N., Mori S. 1992. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J. Infect. Dis* 166:943-944.
- Mori N, Prager D. 1996. Transactivation of the interleukin-1alpha promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins. *Blood.* 87:3410-7.
- Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Hayashi T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Yamasaki Y, Morikawa S, Tomonaga M, Geleziunas R, Yamamoto N. 2002. Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the matrix metalloproteinase-9 gene: potential role in mediating adult T-cell leukemia invasiveness. *Blood.* Feb 99:1341-9.
- Mueller N. 1991. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control.* 2(1):37-52.

- Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N. 1996. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1:S2-7.
- Mukhopadhyay D, Dasso M. 2007. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci.* 32:286-95.
- Mukhopadhyay D, Riezman H. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 315:201-5.
- Mulloy JC, Kislyakova T, Cereseto A, Casareto L, LoMonico A, Fullen J, Lorenzi MV, Cara A, Nicot C, Giam C, Franchini G. 1998. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *J Virol.* 72:8852-60.
- Murakami T, Hirai H, Suzuki T, Fujisawa J, Yoshida M. 1995. HTLV-1 Tax enhances NF-kappa B2 expression and binds to the products p52 and p100, but does not suppress the inhibitory function of p100. *Virology.* 206:1066-74.
- Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Brathwaite A, Holding-Cobham M, Waters D, Cranston B, Hanchard B, Blattner WA. 1989a. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med.* 1;111(7):555-60.
- Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, Goedert JJ, Blattner WA. 1989b. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 15;43(2):250-3.
- Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Holding-Cobham M, Cranston B, Malley K, Bodner AJ, Alexander SS, Blattner WA. 1991. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol.* 133(11):1114-24.
- Murphy EL, Wilks R, Hanchard B, Cranston B, Figueroa JP, Gibbs WN, Murphy J, Blattner WA. 1996. A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. *Int J Epidemiol.* 25(5):1083-9.
- Murphy EL, Frider J, Smith JW, Engstrom J, Sacher RA, Miller K, Gible J, Stevens J, Thomson R, Hansma D, Kaplan J, Khabbaz R, Nemo G. 1997. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology.* 48:315-20.
- Murphy EL, Mahieux R, de Thé G, Tekai F, Ameti D, Horton J, Gessain A. 1998. Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug users: an age-cohort effect for HTLV-II RFLP type aO. *Virology Mar* 15;242(2):425-34.
- Murphy EL, Grant RM, Kropp J, Oliveira A, Lee TH, Busch MP. 2003. Increased human T-lymphotropic virus type II proviral load following highly active retroviral therapy in HIV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 33:655-6.
- Murphy EL, Lee TH, Chafets D, Nass CC, Wang B, Loughlin K, Smith D. 2004a. HTLV Outcomes Study Investigators. Higher human T lymphotropic virus (HTLV)

provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. *J Infect Dis.* 190(3):504-10.

Murphy EL, Wang B, Sacher RA, Frider J, Smith JW, Nass CC, Newman B, Ownby HE, Garratty G, Hutching ST, Schreiber GB. 2004b. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. *Emerg Infect Dis.* 10:109-16.

Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M. 1998. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 4:586-93.

Nagai M. and Jacobson S. 2001. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Curr Opin Neurol* 14:381-386.

Nam SH, Kidokoro M, Shida H, Hatanaka M. 1988. Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease. *J Virol.* 62:3718-28.

Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. 2005. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem.* 280:29653-60.

Neuveut C, Low KG, Maldarelli F, Schmitt I, Majone F, Grassmann R, Jeang KT. 1998. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb. *Mol Cell Biol.* 18:3620-32.

Ng PW, Iha H, Iwanaga Y, Bittner M, Chen Y, Jiang Y, Gooden G, Trent JM, Meltzer P, Jeang KT, Zeichner SL. 2001. Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Oncogene.* 20:4484-96.

Nicot C, Astier-Gin T, Guillemain B. 1997. Activation of Bcl-2 expression in human endothelial cells chronically expressing the human T-cell lymphotropic virus type I. *Virology.* 236:47-53.

Nicot C, Harrod R. 2000. Distinct p300-responsive mechanisms promote caspase-dependent apoptosis by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *Mol Cell Biol.* 20:8580-9.

Nicot C, Mulloy JC, Ferrari MG, Johnson JM, Fu K, Fukumoto R, Trovato R, Fullen J, Leonard WJ, Franchini G. 2001. HTLV-1 p12(I) protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Blood.* 98:823-9.

Nicot C, Dundr M, Johnson JM, Fullen JR, Alonzo N, Fukumoto R, Princler GL, Derse D, Misteli T, Franchini G. 2004. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat Med.* 10:197-201.

- Nicot C, Harrod RL, Ciminale V, Franchini G. 2005. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions. *Oncogene*. 24:6026-34.
- Niinuma A, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Gejyo F, Tanaka N, Sugamura K, Xie L, Green PL, Fujii M. 2005. Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus. *J Virol*. 79:11925-34.
- Novoa P, Penalva de Oliveira AC, Posada Vergara MP, da Silva Duarte AJ, Casseb J. 2007. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. *J Med Virol*. 79:182-7.
- Ohsugi T, Koito A. 2007. Human T cell leukemia virus type I is resistant to the antiviral effects of APOBEC3. *J Virol Methods*. 139:93-6.
- Okochi K, Sato H, Hinuma Y. 1984. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang*. 46(5):245-53.
- Okochi, K. and Sato, H., 1984. Transmission of ATL (HTLV-I) through blood transfusion. *Princess Takamatsu Symp* 15, 129-35.
- Ono A, Ikeda E, Mochizuki M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Sawada T, Yamane S, Tokudome S, Watanabe T. 1998. Provirus load in patients with human T-cell leukemia virus type 1 uveitis correlates with precedent Graves' disease and disease activities. *Jpn J Cancer Res*. 89:608-14.
- Orland JR, Engstrom J, Frider J, Sacher RA, Smith JW, Nass C, Garratty G, Newman B, Smith D, Wang B, Loughlin K, Murphy EL. 2003. HTLV Outcomes Study. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology*. 61:1588-94.
- Osame M, Izumo S, Igata A, Matsumoto M, Matsumoto T, Sonoda S, Tara M, Shibata Y. 1986a. Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet*. Jul 12;2(8498):104-5.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. 1986b. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. May 3;1(8488):1031-2.
- Osame M, Janssen R, Kubota H, Nishitani H, Igata A, Nagataki S, Mori M, Goto I, Shimabukuro H, Khabbaz R, et al. 1990. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol*. 28:50-6.
- Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18:6853-66.

- Paine E, Gu R, Ratner L. 1994. Structure and expression of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope protein. *Virology*. 199:331-8.
- Parker CE, Nightingale S, Taylor GP, Weber J, Bangham CR. 1994. Circulating anti-Tax cytotoxic T lymphocytes from human T-cell leukemia virus type I-infected people, with and without tropical spastic paraparesis, recognize multiple epitopes simultaneously. *J Virol*. 68:2860-8.
- Pawson R., Mufti G.J., Pagliuca A. 1998. Management of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol*. 100:453-458.
- Perkins N.D. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:49-62.
- Persengiev SP, Green MR. 2003. The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis*. 8:225-8.
- Petropoulos L, Lin R, Hiscott J. 1996. Human T cell leukemia virus type 1 tax protein increases NF-kappa B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I kappa B alpha regulatory protein. *Virology*. 225:52-64.
- Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, Bertazzoni U, Re MC, Allibardi S, Poli G, Casoli C. 2007. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood*. 109:1850-6.
- Pinheiro S.R., Lana-Peixoto M.A., Proietti A.B., Orefice F., Lima-Martins M.V., Proietti F.A. 1995. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Arq. Neuropsiquiatr*. 53:777-781.
- Pique C, Ureta-Vidal A, Gessain A, Chancerel B, Gout O, Tamouza R, Agis F, Dokh  lar MC. 2000. Evidence for the chronic in vivo production of human T cell leukemia virus type I Rof and Tof proteins from cytotoxic T lymphocytes directed against viral peptides. *J Exp Med*. 191:567-72.
- Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, Duvall J, Guillerm C, Gessain A, Brady JN. Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res*. 2002 62:3562-71.
- Plancoulaine S, Gessain A, Joubert M, Tortevoys P, Jeanne I, Talarmin A, de Th   G, Abel L. 2000. Detection of a major gene predisposing to human T lymphotropic virus type I infection in children among an endemic population of African origin. *J Infect Dis*. 182(2):405-12.
- Poiesz B.J., Ruscetti F.W., Gazdar A.F., Bunn P.A., Minna J.D., Gallo R.C. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7415-7419.
- Pombo De Oliveira M.S., Loureiro P., Bittencourt A., Chiatton C., Borducchi D., De Carvalho S.M., Barbosa H.S., Rios M., Sill A., Cleghorn F., Blattner W. 1999.

Geographic diversity of adult t-cell leukemia/lymphoma in Brazil. The Brazilian ATLL Study Group. *Int J Cancer*. 29;83(3):291-8.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 24:6058-68.

Quintas S, Moreno T, Lobo-Antunes N, Levy-Gomes A. 2004. Tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated myelopathy in infancy. A case report and review of the literature. *Rev Neurol*. Dec 39:1133-6.

Rafatpanah H, Farid R, Golanbar G, Jabbari Azad F. 2006. HTLV-I Infection: virus structure, immune response to the virus and genetic association studies in HTLV-I-infected individuals. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 5:153-66.

Renjifo B, Osterman J, Borrero I, Essex M. 1995. Nucleotide sequences of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) from a family cluster with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *Res Virol*. 146:93-9.

Ressler S, Morris GF, Marriott SJ. 1997. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *J Virol*. 71:1181-90.

Richardson J.H., Edward A.J., Cruickshank J.K., Rudge P., Dalgleish A.G. 1990. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol*. 64:5682-5687.

Robek MD, Wong FH, Ratner L. 1998. Human T-cell leukemia virus type 1 pX-I and pX-II open reading frames are dispensable for the immortalization of primary lymphocytes. *J Virol*. 72:4458-62.

Robek MD, Ratner L. 1999. Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol*. 73:4856-65.

Rodgers-Johnson P, Gajdusek DC, Morgan OS, Zaninovic V, Sarin PS, Graham DS. 1985. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 30;2(8466):1247-8.

Rosen CA, Sodroski JG, Haseltine WA. 1985. Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:6502-6.

Ross TM, Pettiford SM, Green PL. 1996. The tax gene of human T-cell leukemia virus type 2 is essential for transformation of human T lymphocytes. *J Virol*. 70:5194-202.

Ross TM, Minella AC, Fang ZY, Pettiford SM, Green PL. 1997. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 2 Tax. *J Virol*. 71:8912-7.

Ross TM, Narayan M, Fang ZY, Minella AC, Green PL. 2000. Human T-cell leukemia virus type 2 tax mutants that selectively abrogate Nf κ B or CREB/ATF activation fail to transform primary human T cells. *J Virol*. 74:2655-62.

- Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, Newman B, Lee TH, Chafets DM, Murphy EL. 2005. HTLV Outcomes Study Investigators. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis.* 191:1490-7.
- Rousset R, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P. 1996. Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature.* 381:328-31.
- Salemi M, Cattaneo E, Casoli C, Bertazzoni U. 1995. Identification of IIa and IIb molecular subtypes of human T-cell lymphotropic virus type II among Italian injecting drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 8:516-20.
- Salemi M, Vandamme AM, Desmyter J, Casoli C, Bertazzoni U. 1999. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) and the relationship with its replication strategy. *Gene.* 234:11-21.
- Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K. 2005. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood.* 105:1204-13.
- Satoh M, Toma H, Sugahara K, Etoh K, Shiroma Y, Kiyuna S, Takara M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Nakada K, Fujita K, Kojima S, Hori E, Tanaka Y, Kamihira S, Sato Y, Watanabe T. 2002. Involvement of IL-2/IL-2R system activation by parasite antigen in polyclonal expansion of CD4(+)25(+) HTLV-1-infected T-cells in human carriers of both HTLV-1 and *S. stercoralis*. *Oncogene.* 21:2466-75.
- Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. 2006. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:720-5.
- Schmitt I, Rosin O, Rohwer P, Gossen M, Grassmann R. 1998. Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J Virol.* 72:633-40.
- Segurado AA, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge ML, Marchiori PE. 2002. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:329-33.
- Seiki M, Hattori S, Yoshida M. 1982. Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(22):6899-902.
- Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:3618-22.
- Seiki M, Inoue J, Takeda T, Yoshida M. 1986. Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional activator. *EMBO J.* 5:561-5.

- Seiki M, Inoue J, Hidaka M, Yoshida M. 1988. Two cis-acting elements responsible for posttranscriptional trans-regulation of gene expression of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:7124-8.
- Semmes OJ, Jeang KT. 1992. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax: regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *J Virol*. 66:7183-92.
- Semmes OJ, Jeang KT. 1996. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol*. 70:6347-57.
- Semmes OJ, Majone F, Cantemir C, Turchetto L, Hjelle B, Jeang KT. 1996. HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs. *Virology*. 217:373-9.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 4:E131-6.
- Sheehy N, Lillis L, Watters K, Lewis M, Gautier V, Hall W. 2006. Functional analysis of human T lymphotropic virus type 2 Tax proteins. *Retrovirology*. 21;3:20.
- Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. 2006. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother*. 57:167-70.
- Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW. 2007. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol*. 81:13735-42.
- Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE, Harhaj EW. 2008. The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol*. 9:254-62.
- Sheng M, Sala C. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24:1-29.
- Sherman MP, Saksena NK, Dube DK, Yanagihara R, Poiesz BJ. 1992. Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. *J Virol*. 66:2556-63.
- Shimamoto Y., Yamaguchi M. 1992. HTLV-I induced extranodal lymphomas. *Leuk. Lymphoma* 7:37-45.
- Shimotohno K, Takano M, Teruuchi T, Miwa M. 1986. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:8112-6.

- Shuh M, Hill SA, Derse D. 1999. Defective and wild-type human T-cell leukemia virus type I proviruses: characterization of gene products and trans-interactions between proviruses. *Virology*. 262:442-51.
- Sieburg M, Tripp A, Ma JW, Feuer G. 2004. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax oncoproteins modulate cell cycle progression and apoptosis. *J Virol*. 78:10399-409.
- Siekevitz M, Feinberg MB, Holbrook N, Wong-Staal F, Greene WC. 1987. Activation of interleukin 2 and interleukin 2 receptor (Tac) promoter expression by the trans-activator (tat) gene product of human T-cell leukemia virus, type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:5389-93.
- Silic-Benussi M, Cavallari I, Zorzan T, Rossi E, Hilaragi H, Rosato A, Horie K, Saggiaro D, Lairmore MD, Willems L, Chieco-Bianchi L, D'Agostino DM, Ciminale V. 2004. Suppression of tumor growth and cell proliferation by p13II, a mitochondrial protein of human T cell leukemia virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:6629-34.
- Silverman LR, Phipps AJ, Montgomery A, Ratner L, Lairmore MD. 2004. Human T-cell lymphotropic virus type 1 open reading frame II-encoded p30II is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion. *J Virol*. 78:3837-45.
- Sinha-Datta U, Horikawa I, Michishita E, Datta A, Sigler-Nicot JC, Brown M, Kazanji M, Barrett JC, Nicot C. 2004. Transcriptional activation of hTERT through the NF-kappaB pathway in HTLV-I-transformed cells. *Blood*. 104:2523-31.
- Slattery JP, Franchini G, Gessain A. 1999. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res*. 9(6):525-40.
- Smith MR, Greene WC. 1990. Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev*. 4:1875-85.
- Smith MR, Greene WC. 1992. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology*. 187:316-20.
- Sonoda S. (1990) *Human Retrovirology: HTLV* Blattner W (ed). Raven Press: New York.
- Soriano V, Vallejo A, Gutiérrez M, Tuset C, Cilla G, Martínez-Zapico R, Dronda , Caballero E, Calderón E, Aguilera A, Martín AM, Llibre J, del Romero J, Ortiz de Lejarazu R, Ulloa F, Eirós J, González-Lahoz J. 1996. Epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in Spain. HTLV Spanish Study Group. *Eur J Epidemiol*. 12:625-9.
- Sowa J.M. 1992. Human T lymphotropic virus I, myelopathy, polymyositis and synovitis: an expanding rheumatic spectrum. *J. Rheumatol*. 19:316-318.

- Sugiyama H, Doi H, Yamaguchi K, Tsuji Y, Miyamoto T, Hino S. 1986. Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Med Virol.* 20:253-60.
- Sun SC, Yamaoka S. 2005. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene.* 24:5952-64.
- Suzuki T, Hirai H, Fujisawa J, Fujita T, Yoshida M. 1993. A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CArG box. *Oncogene.* 8:2391-7.
- Suzuki T, Hirai H, Yoshida M. 1994. Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene.* 9:3099-105.
- Suzuki T, Hirai H, Murakami T, Yoshida M. 1995. Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene.* 10:1199-207.
- Suzuki T, Kitao S, Matsushime H, Yoshida M. 1996. HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO J.* 15:1607-14.
- Suzuki Y, Gojobori T. 1998. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *Virus Genes.* 16:69-84.
- Switzer WM, Pieniazek D, Swanson P, Samdal HH, Soriano V, Khabbaz RF, Kaplan JE, Lal RB, Heneine W. 1995. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol.* 69:621-32.
- Tajima K, Tominaga S, Suchi T. 1986. Malignant lymphomas in Japan: epidemiological analysis on adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol Oncol.* 4:31-44
- Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, Yodoi J: Adult T cell leukemia in Japan. 1977. In *Topics in Hematology*. Edited by: Seno S, Takaku F, Irino S. Amsterdam, Excerpta Medica 73-77.
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F, Hattori T, Nishimura H, Tsuda H, Sanada I, Nakada K, Itai Y. 1985a. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Cancer Res.* 45(9 Suppl):4644s-4645s.
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F, Nishimura H, Seiki M, Yoshida M. 1985b. Clinical aspects of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 115:89-97.
- Takatsuki K, Matsuoka M, Yamaguchi K. 1996. Adult T-cell leukemia in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1:S15-9.

- Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M, Arai N. 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol.* 8:466-72.
- Takehara N, Iwahara Y, Uemura Y, Sawada T, Ohtsuki Y, Iwai H, Hoshino H, Miyoshi I. 1989. Effect of immunization on HTLV-I infection in rabbits. *Int J Cancer.* 44:332-6.
- Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. 2003. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 9(1):29-35.
- Tanaka A, Takahashi C, Yamaoka S, Nosaka T, Maki M, Hatanaka M. 1990. Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1071-5.
- Tanaka Y, Hayashi M, Takagi S, Yoshie O. 1996. Differential transactivation of the intercellular adhesion molecule 1 gene promoter by Tax1 and Tax2 of human T-cell leukemia viruses. *J Virol.* 70:8508-17.
- Taylor GP. 1996. The epidemiology of HTLV-I in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1:S8-14.
- Taylor GP, Hall SE, Navarrete S, Michie CA, Davis R, Witkover AD, Rossor M, Nowak MA, Rudge P, Matutes E, Bangham CR, Weber JN. 1999 Effect of lamivudine on human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) DNA copy number, T-cell phenotype, and anti-tax cytotoxic T-cell frequency in patients with HTLV-1-associated myelopathy. *J Virol.* 73:10289-95.
- Taylor GP, Matsuoka M. 2005. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene.* 24:6047-57.
- Taylor JM, Nicot C. 2008. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis.* 13:733-47.
- Tochikura T, Iwahashi M, Matsumoto T, Koyanagi Y, Hinuma Y, Yamamoto N. 1985. Effect of human serum anti-HTLV antibodies on viral antigen induction in vitro cultured peripheral lymphocytes from adult T-cell leukemia patients and healthy virus carriers. *Int J Cancer.* 36:1-7.
- Toro C, Blanco F, García-Gascó P, Sheldon J, Benito JM, Rallón NI, Soriano V. 2007. Human T lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in an HIV-positive patient coinfecting with human T lymphotropic virus type 2 following initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 45:e118-20.
- Tosi G, Pilotti E, Mortara L, De Lerna Barbaro A, Casoli C, Accolla RS. 2006. Inhibition of human T cell leukemia virus type 2 replication by the suppressive action of class II transactivator and nuclear factor Y. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12861-6.

- Tsuchiya H, Fujii M, Niki T, Tokuhara M, Matsui M, Seiki M. 1993. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax activates transcription of the human fra-1 gene through multiple cis elements responsive to transmembrane signals. *J Virol.* 67:7001-7.
- Tsuji T, Sheehy N, Gautier VW, Hayakawa H, Sawa H, Hall WW. 2007. The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax protein is carrier- and energy-independent. *J Biol Chem.* 282:13875-83.
- Turci M, Pilotti E, Ronzi P, Magnani G, Boschini A, Parisi SG, Zipeto D, Lisa A, Casoli C, Bertazzoni U. 2006. Coinfection with HIV-1 and human T-Cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 41:100-6.
- Turci M, Lodewick J, Righi P, Polania A, Romanelli MG, Bex F, Bertazzoni U. 2009. HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax. *Virology.* Feb 3.
- Uchiyama T., Yodoi J., Sagawa K., Takatsuki K. and Uchino H. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50: 481-492.
- Ureta-Vidal A, Angelin-Duclos C, Tortevoeye P, Murphy E, Lepère JF, Buigues RP, Jolly N, Joubert M, Carles G, Pouliquen JF, de Thé G, Moreau JP, Gessain A. 1999. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int J Cancer.* 9;82(6):832-6.
- Vallejo A, Ferrante P, Soriano V, Calabrò ML, Mancuso R, Heredia A, Mannella E, Favero A, Garcia-Sáiz A, Chieco-Bianchi L, González-Lahoz J, Hewlett IK. 1996. Nucleotide sequence and restriction fragment-length polymorphism analysis of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in southern Europe: evidence for the HTLV-IIa and HTLV-IIb subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13:384-91.
- Van PL, Yim KW, Jin DY, Dapolito G, Kurimasa A, Jeang KT. 2001. Genetic evidence of a role for ATM in functional interaction between human T-cell leukemia virus type 1 Tax and p53. *J Virol.* 75:396-407.
- Van Dooren, S., Verschoor, E.J., Fagrouch, Z. and Vandamme, A.M., 2007. Phylogeny of primate T lymphotropic virus type 1 (PTLV-1) including various new Asian and African non-human primate strains. *Infect Genet Evol* 7, 374-81.
- Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 7:266-81.
- Vrieling H, Reesink HW. 2004. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfus Med Rev.* Jan;18(1):46-57.
- Watanabe T, Seiki M, Yoshida M. 1984. HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology.* 133(1):238-41.

- Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. 1995. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol.* 69(5):2863-8.
- Wattel E, Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S. 1996. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1:S92-9.
- Wilks R, Hanchard B, Morgan O, Williams E, Cranston B, Smith ML, Rodgers-Johnson P, Manns A. 1996. Patterns of HTLV-I infection among family members of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Int J Cancer.* 17;65(2):272-3.
- Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. 2005. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7994-7999.
- Wu X, Sun SC. 2007. Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep.* 8:510-5.
- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. 2000. Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK) regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J Biol Chem.* 275:34060-7.
- Xiao G, Cvijic ME, Fong A, Harhaj EW, Uhlik MT, Waterfield M, Sun SC. . 2001. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J* 20:6805-15.
- Xie L, Green PL. 2005. Envelope is a major viral determinant of the distinct in vitro cellular transformation tropism of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *J Virol.* 79:14536-45.
- Xie L, Yamamoto B, Haoudi A, Semmes OJ, Green PL. 2006. PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood.* 107:1980-8.
- Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, Arfi S, Césaire R. 2005. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology.* 2:4.
- Yamada T, Yamaoka S, Goto T, Nakai M, Tsujimoto Y, Hatanaka M. 1994. The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J Virol.* 68:3374-9.
- Yamaguchi K, Kiyokawa T, Futami G, Ishii T, Takatsuki K. 1990. Pathogenesis of adult T cell leukemia from clinical pathologic features. In: Blattner WA , editor. *Human retrovirology: HTLV.* New York: Raven Press. pp. 163-171.

Yamaguchi K, Watanabe T. 2002. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol.* 76 Suppl 2:240-5.

Yamamoto Y, Gaynor RB. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci.* 29:72-9.

Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S. 2002. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood.* 99:88-94.

Yanagihara R, Saitou N, Nerurkar VR, Song KJ, Bastian I, Franchini G, Gajdusek DC. 1995. Molecular phylogeny and dissemination of human T-cell lymphotropic virus type I viewed within the context of primate evolution and human migration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 41 Suppl 1:S145-61.

Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, Osame M, Yoshinaga M, Nagata Y, Tara M, Nomura K, Utsunomiya A, Hanada S, Tajima K, Sonoda S. 2001. HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 17(11):1047-61.

Ye J, Xie L, Green PL. 2003. Tax and overlapping rex sequences do not confer the distinct transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2. *J Virol.* 77:7728-35.

Yeo A., Kaidarova Z., Gobble J. et al. 2007. Long-term abnormalities of complete blood counts in HTLV-1 and -2 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:641-2.

Yin MJ, Christerson LB, Yamamoto Y, Kwak YT, Xu S, Mercurio F, Barbosa M, Cobb MH, Gaynor RB. 1998. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell.* 93:875-84.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. 1982. A retrovirus from human leukemia cell lines: its isolation, characterization, and implication in human adult T-cell leukemia (ATL). *Princess Takamatsu Symp.* 12:285-94.

Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K, Takatsuki K. 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(8):2534-7.

Yoshida M. 2001. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 19:475-96.

Yoshida M. 2005. Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. *Oncogene.* 24:5931-7.

- Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J, Fujisawa J, Matsuoka M. 2008. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol.* 82:9359-68.
- Younis I, Khair L, Dundr M, Lairmore MD, Franchini G, Green PL. 2004. Repression of human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 replication by a viral mRNA-encoded posttranscriptional regulator. *J Virol.* 78:11077-83.
- Younis I, Green PL. 2005. The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci.* 10:431-45.
- Zhang W, Nisbet JW, Bartoe JT, Ding W, Lairmore MD. 2000. Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) functions as a transcription factor and differentially modulates CREB-responsive promoters. *J Virol.* 74:11270-7.
- Zhang W, Nisbet JW, Albrecht B, Ding W, Kashanchi F, Bartoe JT, Lairmore MD. 2001. Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J Virol.* 75:9885-95.
- Zella D, Mori L, Sala M, Ferrante P, Casoli C, Magnani G, Achilli G, Cattaneo E, Lori F, Bertazzoni U. 1990. HTLV-II infection in Italian drug abusers. *Lancet.* 336:575-6.

10. ABBREVIAZIONI

aa:	aminoacidi
AIDS:	acquired immune deficiency syndrome
ATLL:	leucemia/linfoma delle cellule T dell'adulto
ATLV:	Adult T-cell Leukemia Virus
ATO:	triossido d'arsenico
AZT:	zidovudina
bp:	base pairs
cAMP:	AMP ciclico
CBP:	CREB binding protein
CC:	Chemokine (C-C motif)
CCL3:	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL3L1:	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1
cDNA:	DNA complementare
CDK:	chinasi ciclina dipendenti
CMV:	citomegalovirus
CRE:	elementi di risposta all'AMP ciclico, cAMP
CREB/ATF:	CRE binding/activating transcription factor
CSF:	fluido cerebrospinale
CTL:	linfociti T citotossici
CY:	citoplasma
DMEM:	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA:	acido desossiribonucleico
DTT:	ditiotreitolo
EDTA:	acido etilendiamminicotetracetico
F:	Flag-6His
FAM:	6-carboxy-fluorescein
FCS:	Fetal Calf Serum
GFP:	green fluorescent protein
GLB:	Gel Loading Buffer
GLUT-1:	Glucose Transporter 1
HAART:	highly active antiretroviral therapy
HAM/TSP:	HTLV associated myelopathy/tropical spastic paraparesis
HBZ:	HTLV-1 <i>b</i> -ZIP factor
HCV:	virus dell'epatite C
HERN:	HTLV european research network
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HLA:	human leukocyte antigen
HTLV:	human T cell lymphotropic virus
IDU:	intravenous drug users
IGG:	Immunoglobulina G
IL-2:	interleuchina 2
IKK:	I κ B kinase
IκB:	inibitore κ B
IPTG:	Isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside
Kb:	Kilo base
kDa:	kilo Dalton
LB:	Luria Bertani
LTNP:	Long Term Non Progressor
LTR:	long terminal repeat
MAP3K:	mitogen-activated protein 3 kinase

MEKK:	mitogen activated protein kinase/ERK kinase
MHC:	complesso maggiore d'istocompatibilità
mRNA:	RNA messaggero
MTOC:	centro d'organizzazione dei microtubuli
NB:	nuclear bodies
NES:	segnali di esport nucleare
NF-κB:	nuclear factor κ B
NIK:	NF- κ B inducing kinase
NLS:	segnali di localizzazione nucleare
N-term:	estremità ammino-terminale
ORF:	open reading frame
PBMC:	peripheral blood mononuclear cells
PBS:	phosphate buffered saline
PCD:	morte cellulare programmata
PCR:	polymerase chain reaction
PDZ:	post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (zo-1)
RNA:	acido ribonucleico
RT:	retrotrascrittasi
SAC:	spindle assembly checkpoint
SAP:	Schrimp Alkaline Phosphatase
SDS:	sodio dodecil solfato
SRF:	fattori di risposta al siero
SS:	<i>Strongyloides stercoralis</i>
ssRNA:	RNA a singolo filamento
STLV:	retrovirus linfotropici presenti nelle scimmie
SU:	componente amino-terminale di superficie
SUMO:	small ubiquitin-related modifier
TAK:	TGF- β activating kinase
TAMRA, TMR:	6-carboxy-tetramethylrhodamine
TBS:	tris buffer saline
TM:	componente carbossi-terminale transmembrana
TNF:	tumor necrosis factor
TNFR:	tumor necrosis factor receptor
TSP/HAM:	Tropical Spastic Paraparesis/HTLV Associated Myelopathy
TxRE:	elementi di risposta a Tax
Ub:	ubiquitin

11. PUBBLICAZIONI

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Gene 365 (2006) 119–124

GENE
 SECTION
 EVOLUTIONARY GENOMICS
www.elsevier.com/locate/gene

Localization of human T-cell lymphotropic virus type II Tax protein is dependent upon a nuclear localization determinant in the N-terminal region

Marco Turci, Maria Grazia Romanelli, Pamela Lorenzi, Paola Righi, Umberto Bertazzoni*

Department of Mother and Child, Biology and Genetics, University of Verona, Strada Le Grazie 8, 37134 Verona, Italy

Received 4 May 2005; received in revised form 5 September 2005; accepted 27 September 2005

Available online 6 December 2005

Abstract

Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) types I and II are closely related oncogenic retroviruses that have been associated with lymphoproliferative and neurological disorders. The proviral genome encodes a trans-regulatory Tax protein that activates viral genes and upregulates various cellular genes involved in both cell growth and transformation. Tax proteins of HTLV-I (Tax-I) and HTLV-II (Tax-II) exhibit more than 77% aa homology and expression of either Tax-I or Tax-II is sufficient for immortalization of cultured T lymphocytes. Tax-I shuttles from the nucleus to the cytoplasm and accumulates within the nucleus, whereas Tax-II is found mainly in the cytoplasm. In the present study we have used recombinant vectors to analyze the size and structure of the nuclear localization domain within the Tax-II protein sequence. The Tax-II protein was expressed in HeLa cells either as the complete protein, or regions thereof, that were individually fused to the green fluorescent protein (GFP). Immunoblot analysis of the fused Tax-II products confirmed their expression and size. Fluorescence microscopy studies indicated that the complete Tax-II as well as N-truncated forms presented a punctuate cytoplasmic distribution and that a nuclear localization determinant is confined to within the first 60 aa of Tax-II. Accordingly, site directed mutagenesis and deletion of specific sequences within the first 60 aa showed that the nuclear determinant lies within the first 41 residues of Tax-II. These results point to a direct involvement of the amino-terminal residues of Tax-II protein in determining its nuclear functionality.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: NLS; HTLV; Nuclear import; Cellular localization

1. Introduction

Human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type I and type II are closely related oncogenic retroviruses. HTLV-I is clearly associated with adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL), a malignancy of CD4⁺ T lymphocytes, and with a chronic neurological disease known as HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (Poesz et al., 1980;

Blattner et al., 1983; Gessain et al., 1985). HTLV-II has not yet been linked to any specific pathologies, but it has been detected in subjects suffering from neurological and lymphoproliferative disorders (Araujo et al., 2002). HTLV-I is tropic in vivo for CD4⁺ T-cells, while HTLV-II preferentially infects CD8⁺ T-cells (Hoffman et al., 1992; Ijichi et al., 1992; Casoli et al., 1995). The genomes of HTLV-I and HTLV-II carry their own promoter and enhancer elements in the long terminal repeat (LTR) sequences and, in addition to the structural and enzymatic genes gag, pol, and env, contain other open reading frames (ORF). These extra ORFs code for a transcriptional activator (Tax), a post-transcriptional regulator (Rex), and three accessory proteins (Albrecht and Lairmore, 2002). Tax increases the rate of transcription of viral genes, but is also able to transactivate the promoters of numerous cellular genes involved in cell growth and differentiation, cell cycle control and DNA repair (Bex and Gaynor, 1998; Jeang et al., 2004). The interaction of Tax with several cellular transcription factors,

Abbreviations: aa, amino acid(s); ATLL, adult T-cell leukaemia/lymphoma; bp, base pair(s); CAMP, cyclic adenosine 3',5' monophosphate; CREB/ATF, CAMP responsive element binding/activating transcription factor; GFP, green fluorescent protein; HAM/TSP, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HTLV-I, human T-lymphotropic virus type I; HTLV-II, human T-cell lymphotropic virus type II; LTR, long terminal repeat; NES, nuclear export signal; ORF, opening reading frame; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-PA-gel electrophoresis.

* Corresponding author. Tel.: +39 045 8027204; fax: +39 045 8027180.

E-mail address: umberto.bertazzoni@univr.it (U. Bertazzoni).0378-1119/\$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.gene.2005.09.043

including cAMP, CREB/ATF members and components of the NF- κ B/Rel signalling complex, results in the upregulation of many cellular genes, including genes for IL-2 and the IL-2 receptor. The upregulation of these genes is responsible for promoting cellular transformation as well as disruption of both the cell-cycle control and apoptosis. In addition, it has been demonstrated that Tax both upregulates the cell-cycle regulatory proteins cyclin D2 and D3, CD4/C4, CDK6, p15 and p16 and interacts with an M-phase regulator (Araujo et al., 2002). It also modifies the function of the tumor suppressor protein p53, induces IL-2-independent proliferation and resistance to apoptosis in IL-2-dependent CTLL-2 cells and induces bcl-2 and bcl-XL in vitro expression (Azran et al., 2004).

Expression of either Tax-I (HTLV-I) or Tax-II (HTLV-II) is sufficient for immortalization of T lymphocytes in culture (Grassmann et al., 1989; Ross et al., 2000). Tax-I and Tax-II of both subtypes HTLV-IIa and HTLV-IIb inhibit cellular p53 activity, but at different levels (Mahieux et al., 2000). Rat fibroblast cell lines are less efficiently transformed by Tax-II as compared to Tax-I (Endo et al., 2002). Transgenic mice expressing either the Tax-I or Tax-II proteins, under the control of the Ick promoter, have recently been used to demonstrate the oncogenic properties of Tax proteins. The transgenic mice developed a spectrum of serious pathologies, including lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly and mesenteric tumors (Hall et al., 2004). Recently we have contributed to a study demonstrating that the MHC class transactivator, CIITA, interferes with HTLV-II replication due to specific inhibition of Tax-mediated transactivation of the LTR promoter (Casoli et al., 2004). Although Tax-I and Tax-II proteins exhibit more than 77% aa homology and have well-conserved functional regions, notable differences in their intracellular distribution were reported. Tax-I is localized predominantly in the cell nucleus (Smith and Greene, 1992). In transfected cells the protein accumulated in discrete nuclear bodies called Tax Speckled Structures (Semmes and Jeang, 1996). Tax-I contains a nuclear export signal (NES) and behaves as a shuttling protein (Alefantis et al., 2003). In addition, it may be detected in different nucleus/cytoplasm ratios, depending on the cell type used (Burton et al., 2000; Cheng et al., 2001). Tax-II is located predominantly in the cytoplasm and a minimal sequence responsible for this sub-cellular distribution has been characterized within aa 90 to 100 (Meertens et al., 2004). Although previous studies have indicated that Tax proteins contain a nuclear localization signal (NLS) encompassing the first 60 aa (Smith and Greene, 1992), the sequence has not been unambiguously characterized (Gitlin et al., 1991; Semmes and Jeang, 1992b; Ross et al., 1997) nor has it been demonstrated that it can be recognized by the importin transport system, a prerequisite for classification as a true NLS.

In the present study we have characterized the N-terminal region of Tax-II to clarify its contribution transporting Tax to the nucleus. We have constructed a series of Tax-II green fluorescent protein (GFP) vectors to pinpoint the minimal Tax-II sequence required for nuclear localization. By using deletion mutants within the first 60 aa of Tax-II, we have studied the contribution of specific aa to its sub-cellular localization.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and transient expression by transfection

Adherent HeLa or 293T cells were maintained in an exponential growth phase by culture in Dulbecco's modified Eagles medium supplemented with 10% fetal calf serum. Media contained glutamine (2.0 mM) and gentamicin (50 (g/ml)). For DNA transfection experiments, cells were plated at a density of 5×10^5 cells/35-mm dish and allowed to grow under normal culture conditions for 20 h before transfection. Reporter plasmids at the amount of 2 μ g were transfected using LipofectAMINE PLUS reagent (Life Technologies) and harvested 24 h later.

2.2. Construction of expression vectors

The pX portion of HTLV-IIb was amplified by PCR from proviral DNA in infected PBMCs and sequenced. The cells were kindly provided by C. Casoli (University of Parma) and were from patient PR-46, infected by HTLV-IIb. Tax-II open reading frame was re-amplified by PCR and cloned into pCDNA3 GFP CT vector using GFP Fusion TOPO TA Expression Kits (Invitrogen). The Tax specific aa mutagenesis and sequence deletion were performed using the PCR overlapping method. The entire sequence of tax gene of PR-46 was submitted to GenBank and was given Accession Number DQ022075. All constructs were sequenced to verify the presence of correct reading frames and mutations.

2.3. Green fluorescent protein analyses

Twenty-four hours after transfection, cells were washed with PBS and fixed in 2% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 20 min. Sub-cellular localization of the Tax-GFP fusion proteins was examined using a Nikon Eclipse 80i microscope with an epifluorescence attachment.

2.4. Western immunoblot analyses

Twenty-four hours after transfection, cells were washed twice with PBS, collected by 10 mM EDTA-PBS and lysed (CHAPS/Urea, Sigma C0481) in the presence of protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science). Cells were sonicated once for 10 s and cell debris was pelleted by centrifugation. Samples were boiled for 5 min, loaded into 10% SDS-polyacrylamide gels for electrophoresis (SDS-PAGE) with MagicMark XP Western Standard (Invitrogen), and subsequently transferred onto nitrocellulose membrane (Trans-Blot Transfer Medium, Biorad). The membranes were blocked in 10% skim milk-PBS solutions and incubated with a 1:1000 dilution of primary mouse monoclonal antibody to GFP (11E5, Molecular Probe), followed by a 1:3000 dilution of secondary antibody (Goat Anti-Mouse IgG H+L-HRP Conjugate, Biorad). Antibodies were diluted in 1% skim milk-PBS solutions and incubation time was 1.5 h for each antibody. Finally, the bands of labelled proteins were

constructs with different C-terminal truncations of Tax-II protein that were transfected into HeLa cells with the recombinant vectors pCDNA3–Tax-II–GFP is shown in Fig. 2. When the complete Tax-II protein was expressed as a 356 aa-GFP fusion protein, the fluorescence was observed to be localized in the cytoplasm (Fig. 2B, panels c, d) in a punctuate distribution, whereas it diffused to both the nucleus and cytoplasm for the GFP only (Fig. 2B, panels a, b). A punctuate cytoplasmic distribution was also visualized with truncations to 331 (331-GFP, Fig. 2B panels e, f) and 156 residues (156-GFP, Fig. 2B, panels g, h). By deleting the C-terminal region to 115 residues (115-GFP), the fused proteins were distributed uniformly in the cytoplasm (Fig. 2B, panels i, j) and lacked the typical speckled pattern of 331- and 156-GFP. These results suggest that cytoplasmic punctuate distribution is governed by sequences between aa 115 and 156 of Tax-II. By reducing the fused Tax protein to the first 60 residues (60-GFP), the fluorescence was confined to the nucleus (Fig. 2B, panels k, l), whereas a shorter fragment composed of first 33 aa (33-GFP) diffused to both the nucleus and cytoplasm of transfected cells (Fig. 2B, panels m, n). Western blot analysis using monoclonal GFP antibody showed that the fused Tax-II products were all expressed in HeLa cells and had molecular sizes corresponding to those expected for the complete or truncated Tax–GFP proteins (Fig. 2C, lanes 1–5 and 8). These results are in agreement with previous observations documenting the location of a putative NLS to within to the first 58 aa of Tax-I (Meertens et al., 2004).

Deletion of the first 41 or 60 aa at the N-terminal region of Tax-II-GFP clone resulted in the absence of fluorescence signal

3.1. Presence of a nuclear localization determinant within the N-terminal region of Tax-II

Tax-II localizes mainly within cytoplasmic loci, although it is shuttled first to the nucleus as a result of a putative NLS at the amino-terminal region (Meertens et al., 2004). However, the domain needed for Tax nuclear transport has not yet been adequately characterized (Gidlin et al., 1991; Semmes and Jeang, 1992a,b; Smith and Greene, 1992).

To determine the size and structure of Tax-II NLS like protein domain, we have systematically analyzed the N-terminal region for the specific sequences that govern nuclear import. The analysis by fluorescence microscopy of GFP fusion

Isolate		
PR-46	MAHFFPGQSSLLYGYPVYFGDCVQADWCVPWSGGLCSTRLHRHALLATCEPHQLTWDPID	60
HTLV-IIb	MAHFPGQSSLLYGYPVFVEDDVCQADWCPVSGGLCSTRLHRHALLATCEHQLTWDPID	60
HTLV-IIa	MAHFPGQSSLLYGYPVYFGDCVQADWCVPWSGGLCSTRLHRHALLATCEPHQLTWDPID	60
HTLV-I	MAHFPGQSSLLYGYPVYFGDCVQGDWCSIGGLCSARLHRHALLATCEHQITWDPID	60
	***** *****	
PR-46	GRVVSSPLQYLIRLPRLFPTQRTAKTLKVLTPPTTVSPVKPVPAFFQSMRKHITYRNGCL	120
HTLV-IIb	GRVVSSPLQYLIRLPRLFPTQRTAKTLKVLTPPTTVSPVKPVPAFFQSMRKHITYRNGCL	120
HTLV-IIa	GRVVSSPLQYLIRLPRLFPTQRTAKTLKVLTPPTTVSPVKPVPAFFQSMRKHITYRNGCL	120
HTLV-I	GRVIGSALQYLIRLPRLFPTQRTSKTLKVLTPPTTHITPNIPPSFLQAMRKYSPPFRNGYM	120
	;*.**:**;*:***** * .*:**:*:**:***:***:	
PR-46	EPTLDGDLPSLAFFPEPGLRFNIYTWTGKTVCVLYLQGLSPMTWPIIPHVICFCHPRLQG	180
HTLV-IIb	EPTLDGDLPSLAFFPEPGLRFNIYTWTGKTVCVLYLQGLSPMTWPIIPHVICFCHPRLQG	180
HTLV-IIa	EPTLDGDLPSLAFFPEPGLRFNIYTWTGKTVCVLYLQGLSPMTWPIIPHVICFCHPRLQG	180
HTLV-I	EPTLQGLHLFSFDPLGRQNLYTWGLSRVCMVLYQLSPMTIWPPLLPHVICFCHPRLQG	180
	*****;*:**;*****;** ***:***;*:**;*****;***** ** *	
PR-46	AFLTIVPLKRBEELLYKMFLHTAGAVILPEDDLLTMFPQVRAPCIQTAWCTGLLPHYIS	240
HTLV-IIb	AFLTIVPLKRBEELLYKMFLHTAGAVILPEDDLLTMFPQVRAPCIQTAWCTGLLPHYIS	240
HTLV-IIa	AFLTIVPLKRBEELLYKMFLHTAGAVILPEDDLLTMFPQVRAPCIQTAWCTGLLPHYIS	240
HTLV-I	AFLTIVPKRIEELLYKLSTTGAILILPEDCLITPMQPVRAPVTITAWQNGILLPFST	240
	***** ** ** ** **	
PR-46	LTTPLGLINTFNDGSPMISGPCFKACQPSLVQSSLLIFEKFQTKAFHPSYLLSHQLIQYS	300
HTLV-IIb	LTTPLGLINTFNDGSPMISGPCFKACQPSLVQSSLLIFPKFTKAFHIPSYLLSHQLIQYS	300
HTLV-IIa	LTTPLGLINTFNDGSPMISGFYKACQPSLVQSSLLIFEFKFAKAFHPSYLLSHQLIQYS	300
HTLV-I	LTTPLGLIWTFDTGTMEISGCFKDQGPSLVQSSLSIFHKFQTKAHPHYLLSHGLIQYS	300
	***** ** ** ** *	
PR-46	SFINHLHLDFEYNTNIPVISILFNKGEGADDNCQDPPE - PAAQGESSTQRKVRPSHTNNPK	356
HTLV-IIb	SFINHLHLDFEYNTNIPVISILFNKGEGADDNCQDPPE - PAAQGESSTQRKVRPSHTNNPK	356
HTLV-IIa	SFINHLHLDFEYNTNIPVISILFNKEAADNGD -	331
HTLV-I	SFINHLHLFEYNTNIPISILFNKEAADNDHIEPQISPGLEPPSEKHFBRTEV----	353
	***** ** ** ** *	

Fig. 1. Comparison of the aa sequence of Tax-I and Tax-II proteins. Amino acids alignment of Tax proteins of HTLV-I, HTLV-II (subtypes IIa and IIb), GenBank Accession Number 6983837, 1463040, 348139 and PR-46 (DQ022075). Alignment was done by CLUSTALW program. Asterisks show identical aa and dots show similar aa.

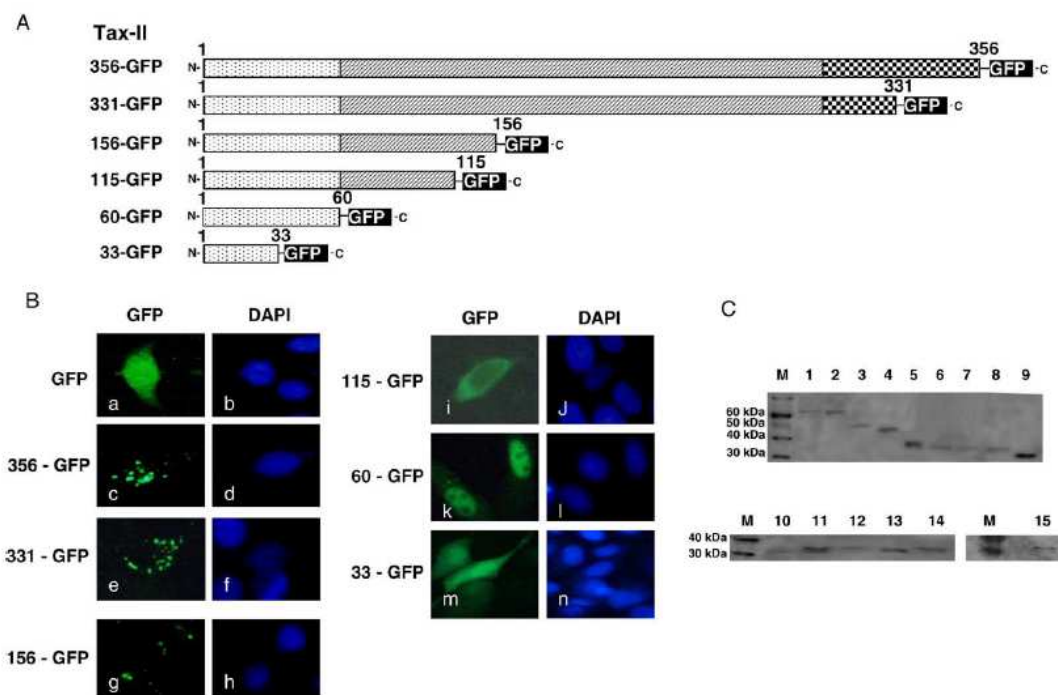


Fig. 2. Analysis by fluorescence microscopy of different GFP N-terminal Tax-II fusion constructs transfected into HeLa cells. (A) Schematic representation of Tax-II regions used to produce GFP fusion proteins. Structural domains are diagrammed. (B) HeLa cells transiently transfected with either GFP alone or with Tax-II-GFP plasmids were fixed and nuclei were visualized by staining cells with DAPI-solution. Photomicrographs (40 \times) were taken using a Nikon digital camera. Images of cells that are representative of the entire population are shown. (C) Western blot analysis of Tax-II-GFP fusion protein detected in HeLa cell lysates. Cells lysates of transfected HeLa cells were electrophoresed on 10% SDS-acrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were probed with monoclonal GFP antibody. Molecular weight markers are shown on the left (M). The numbers are relative to the following samples: (1) 356-GFP; (2) 331-GFP; (3) 156-GFP; (4) 115-GFP; (5) 60-GFP; (6) 51-GFP; (7) 41-GFP; (8) 33-GFP; (9) GFP; (10) del 2-21; (11) del 3; (12) del 17-20; (13) del 21-24; (14) 60-GFP; (15) del 2-21, 42-60.

in transfected HeLa cells and of corresponding bands in immunoblots (data not shown). Sequence analyses confirmed the presence of a correct open reading frame in the constructs. In order to determine if the negative results were linked to transfection on HeLa cells, we analyzed the same constructs on 293T transfected cells but also in this case no fluorescence signal was observed. These data suggest that extensive deletion of the first 60 aa region is blocking Tax-II expression and/or is inducing its degradation.

3.2. Site-directed mutagenesis and deletion of sequences from the Tax-II nuclear localization determinant

The Tax-II protein sequence was screened for the presence of canonical NLSs using PSORT II server (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) (Nakai and Horton, 1999) and/or by the predictNLS program of Columbia University Bioinformatic center (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>) (Cokol et al., 2000). The programs, which allow comparison of the test protein sequence with a database of known NLS motifs, revealed no such elements within the first 60 aa sequence of Tax-II. Alignment by ClustalW of Tax-II subtypes IIa and IIb

with Tax-I showed an almost 90% identity in the first 60 aa, indicating that the region is well conserved (Fig. 1).

To characterize the structure of the functional nuclear localization determinant of Tax-II, we constructed a series of expression vectors with deletions of specific residues distributed along the region of the first 60 aa. The following GFP fused deletion mutants were obtained: del 3; del 5-7; del 9-10; del 11-12; del 15-16; del 17-20; del 21-24; del 27-28; del 39-40; del 41-43 and del 53-54.

Deletion of a few residues had no impact on nuclear localization of these mutants that were transiently expressed in HeLa cells (Fig. 3B, panels a, b, c, d and data not shown). The single exception was mutant del 17-20 that localized both in the nucleus and cytoplasm of transfected cells (Fig. 3B, panels e, f). We also analyzed a mutant deleted of aa residues 15-16 and 39-40 that resulted on a nuclear distribution in 293T transfected cells (Fig. 3B, panels g, h).

Since the distribution of mutant 33-GFP was not restricted to the nucleus, but also diffused to the cytoplasm (see also Fig. 2B), it appears that the presence of the first 33 aa is necessary, but not sufficient, for nuclear targeting. Therefore, we deleted stretches of sequences at both ends of the 60 aa fragment and

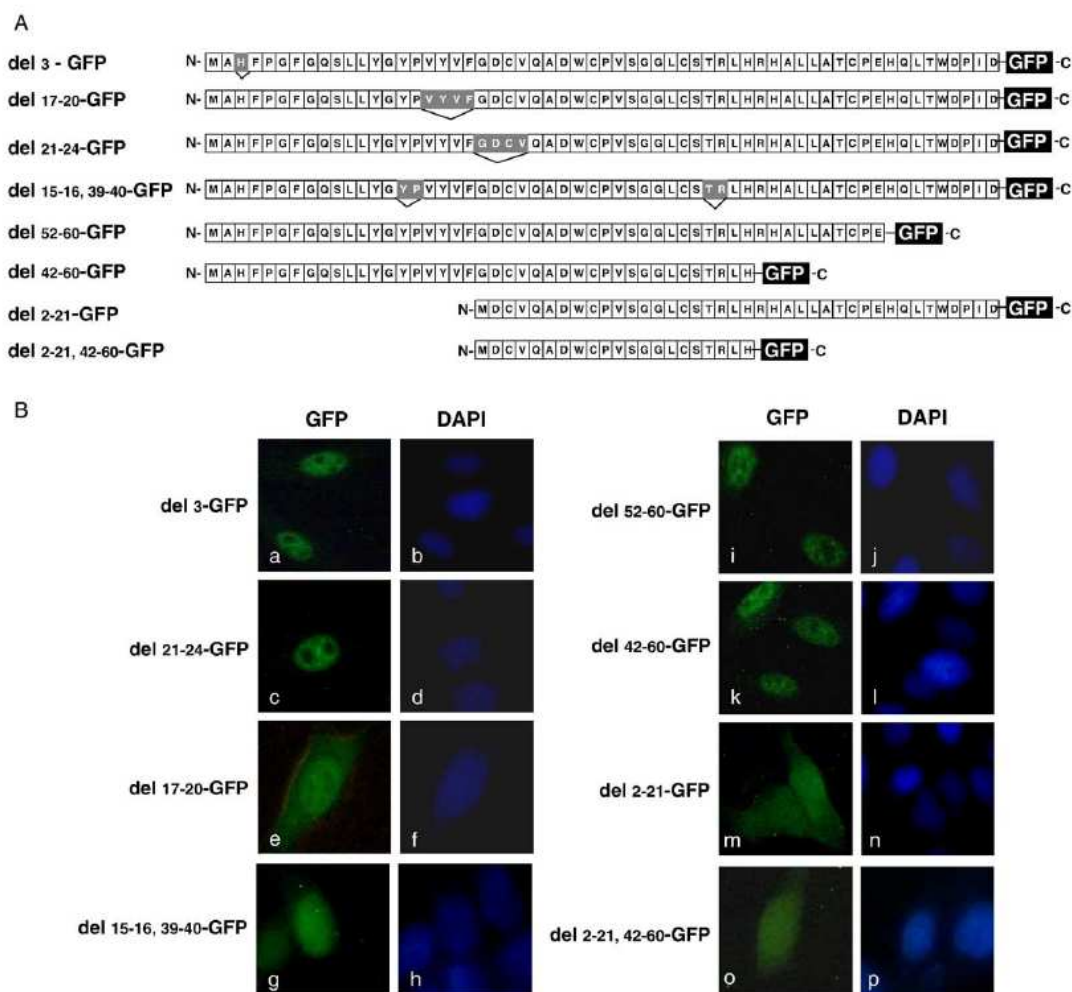


Fig. 3. Analysis by fluorescence microscopy of deletion mutants of Tax-II first 60 aa. HeLa or 293T cells were transfected with deletion mutants of Tax-GFP-60 recombinant plasmid. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed, stained and visualized as described in Fig. 2. (A) Schematic representation of first 60 aa of Tax-II with deletions of specific residues, outlined in grey, and of stretches of C-terminal and N-terminal sequences. (B) Cells transiently transfected with deletion fragments of Tax-II-60-GFP were fixed and analyzed by fluorescent microscopy. Nuclei were stained with DAPI-solution (see also Fig. 2). Images of cells that are representative of the entire population are shown.

inserted the corresponding products into expression vectors as described in Materials and methods. Deletions of 9 aa (del 52–60-GFP) or 19 aa (del 42–60-GFP) at the C-terminal end of Tax-II-60 did not alter the nuclear distribution of the protein (Fig. 3B, panels i, j and k, l). However the deletion of aa 2–21 resulted in a more diffuse localization of product del 2–21-GFP as well as for product del 2–21, 42–60-GFP (Fig. 3B, panels o, p). Immunoblot analysis of lysates of transfected HeLa cells with GFP antibody revealed bands corresponding to the expected molecular size of the fused deletion mutant proteins (Fig. 2C, lanes 6–7 and 10–15). These results indicate that the determinant for nuclear localization is contained within the first

41 residues of Tax-II. When residues 2–21 or 17–20 of the complete Tax-II-GFP clone were deleted, no fluorescence was observed in HeLa nor in 293T transfected cells and no specific signals for Tax-II-GFP fusion proteins were detected by immunoblot analysis in lysed transfected cells (data not shown), thus confirming what was observed by deleting the first 41 or 60 aa at the N-terminal region.

3.3. Conclusions

The results presented in this report demonstrate that, although Tax-II protein accumulates prevalently in the

cytoplasm, it contains a determinant for nuclear localization. The sequence that contributes to nuclear import is present within the first 41 N-terminal residues of the Tax-II protein.

It was reported that Tax-I defective in the first 58 aa is retained within the cytoplasm as a complex with p65 (Rel A), whereas the wild type Tax-I is translocated into the nucleus (Azran et al., 2005). These data support the hypothesis that Tax-II protein could be translocated into the nucleus by interacting with the p65 (Rel A) protein that contains a functional NLS. Experiments are planned to establish the role of this factor in Tax-II sub-cellular localization and function.

Acknowledgments

This work was partially funded by PRIN-MIUR E.F. 2003, by Fondazione Cariverona, call 2002 "Environment and suitable development" and call 2004 "Technology-Development Integration" and by National Program of Research against AIDS of the Istituto Superiore di Sanità (Grant 40F.12 to U. Bertazzoni). We thank Donato Zipeto for useful discussions.

References

- Albrecht, B., Lairmore, M.D., 2002. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 396–406.
- Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E.W., Grant, C., Wigdahl, B., 2003. Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J. Biol. Chem.* 278, 21814–21822.
- Araujo, A., Takahashi, H., Hall, W., 2002. Concomitant infections with human immunodeficiency virus type 1 and human T-lymphotropic virus types 1 and 2. *Polymicrobial Diseases*. ASM Press, Washington.
- Azran, I., Schavinsky-Khrapunsky, Y., Aboud, M., 2004. Role of tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* 1, 20.
- Azran, I., Jeang, K.T., Aboud, M., 2005. High levels of cytoplasmic HTLV-1 Tax mutant proteins retain a Tax–NF– κ B–CBP ternary complex in the cytoplasm. *Oncogene* 24, 4521–4530.
- Bex, F., Gaynor, R.B., 1998. Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein. *Methods* 16, 83–94.
- Blattner, W.A., Takatsuki, K., Gallo, R.C., 1983. Human T-cell leukemia-lymphoma virus and adult T-cell leukemia. *JAMA* 250, 1074–1080.
- Burton, M., Upadhyaya, C.D., Maier, B., Hope, T.J., Semmes, O.J., 2000. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *J. Virol.* 74, 2351–2364.
- Casoli, C., Cimarelli, A., Bertazzoni, U., 1995. Cellular tropism of human T-cell leukemia virus type II is enlarged to B lymphocytes in patients with high proviral load. *Virology* 206, 1126–1128.
- Casoli, C., De Lerma Barbaro, A., Pilotti, E., Bertazzoni, U., Tosi, G., Accolla, R.S., 2004. The MHC class II transcriptional activator (CIITA) inhibits HTLV-2 viral replication by blocking the function of the viral transactivator Tax-2. *Blood* 103, 995–1001.
- Cheng, H., et al., 2001. Human T cell leukemia virus type 1 Tax associates with a molecular chaperone complex containing hTid-1 and Hsp70. *Curr. Biol.* 11, 1771–1775.
- Cokol, M., Nair, R., Rost, B., 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* 1, 411–415.
- Eiraku, N., et al., 1996. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J. Virol.* 70, 1481–1492.
- Endo, K., et al., 2002. Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than HTLV-1 Tax. *J. Virol.* 76, 2648–2653.
- Gessain, A., et al., 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407–410.
- Gitlin, S.D., Lindholm, P.F., Marriott, S.J., Brady, J.N., 1991. Transdominant human T-cell lymphotropic virus type I TAX1 mutant that fails to localize to the nucleus. *J. Virol.* 65, 2612–2621.
- Grassmann, R., et al., 1989. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3351–3355.
- Hall, W., Sawa, H., Nagashima, W., et al., 2004. Translational research in HIV/AIDS and AIDS-related malignancies. *International Meeting of the Institute of Human Virology*. Baltimore, p. 66.
- Hoffman, P.M., et al., 1992. Human T-cell leukemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11784–11788.
- Ijichi, S., Ramundo, M.B., Takahashi, H., Hall, W.W., 1992. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). *J. Exp. Med.* 176, 293–296.
- Jeang, K.T., Giam, C.Z., Majone, F., Aboud, M., 2004. Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 279, 31991–31994.
- Lewis, M.J., et al., 2000. Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology* 271, 142–154.
- Mahieux, R., et al., 2000. Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function. *J. Virol.* 74, 6866–6874.
- Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A., Mahieux, R., 2004. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* 279, 43307–43320.
- Nakai, K., Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24, 34–36.
- Pardi, D., Kaplan, J.E., Coligan, J.E., Folks, T.M., Lal, R.B., 1993. Identification and characterization of an extended Tax protein in human T-cell lymphotropic virus type II subtype b isolates. *J. Virol.* 67, 7663–7667.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C., 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 7415–7419.
- Ross, T.M., Minella, A.C., Fang, Z.Y., Pettiford, S.M., Green, P.L., 1997. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 2 Tax. *J. Virol.* 71, 8912–8917.
- Ross, T.M., Narayan, M., Fang, Z.Y., Minella, A.C., Green, P.L., 2000. Human T-cell leukemia virus type 2 tax mutants that selectively abrogate NF κ B or CREB/ATF activation fail to transform primary human T cells. *J. Virol.* 74, 2655–2662.
- Semmes, O.J., Jeang, K.T., 1992a. HTLV-I Tax is a zinc-binding protein: role of zinc in Tax structure and function. *Virology* 188, 754–764.
- Semmes, O.J., Jeang, K.T., 1992b. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax: regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *J. Virol.* 66, 7183–7192.
- Semmes, O.J., Jeang, K.T., 1996. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J. Virol.* 70, 6347–6357.
- Smith, M.R., Greene, W.C., 1992. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology* 187, 316–320.

ARTICLE IN PRESS

VVIRO-05080; No. of pages: 6; 4C: 3

Virology xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

Rapid Communication

HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax

Marco Turci^a, Julie Lodewick^b, Paola Righi^a, Angela Polania^b, Maria Grazia Romanelli^a, Françoise Bex^{b,1}, Umberto Bertazzoni^{a,*,1}^a Department of Mother and Child, Biology and Genetics, Section of Biology and Genetics, University of Verona, Strada Le Grazie 8, I-37134 Verona, Italy^b Institute for Microbiological Research J.-M. Wlame and Laboratory of Microbiology, Université Libre de Bruxelles, 1 Avenue E. Gryson, B-1070 Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2008

Returned to author for revision

21 November 2008

Accepted 7 January 2009

Available online xxx

Keywords:

HTLV

Tax

CREB

NF- κ B

Ubiquitination

Sumoylation

Nuclear bodies

ABSTRACT

HTLV-1 is more pathogenic than HTLV-2B. The difference is generally attributed to the properties of their individual transactivating Tax proteins. By using internal Flag-6His tagged Tax-1 and Tax-2B, which display transcriptional activities comparable to the untagged proteins and can be recognized by a single anti-Flag antibody, we demonstrate that Tax-2B is modified by ubiquitination and sumoylation. In addition, Tax-2B is distributed in punctuate nuclear structures that include the RelA subunit of NF- κ B, as has been previously demonstrated for Tax-1.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Human T-cell leukemia viruses type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) share a common genomic structure but differ significantly in their pathogenic properties (Araujo and Hall, 2004; Matsuoka and Jeang, 2007). This difference is generally attributed to the properties of their transactivating Tax proteins, Tax-1 and Tax-2, both of which activate gene expression via the ATF/CREB and NF- κ B pathways (Lewis et al., 2002). However, these proteins present distinct phenotypic differences, consistent with a more robust transformation capacity of Tax-1 in comparison to Tax-2 (Feuer and Green, 2005). These differences include a unique capacity of Tax-1 to interact with PDZ domain-containing proteins (Xie et al., 2006), to induce micronuclei formation (Semmes et al., 1996) and cell cycle arrest in human CD34 cells (Tripp et al., 2005), whereas Tax-2 has a reduced ability to inhibit the transcriptional activity of the tumor suppressor p53 (Mahieux et al., 2000).

A non-canonical nuclear localization signal present in the Tax-1 amino-terminal domain (Gitlin et al., 1991) and an export signal in the central domain, control Tax-1 shuttling between nuclear and cytoplasmic compartments (Tsuiji et al., 2007). In addition, Tax-1 intracellular localization is strictly controlled by post-translational

modifications (Lamsoul et al., 2005). Ubiquitination results in its retention in the cytoplasm and sumoylation results in the formation of Tax-1 containing nuclear bodies and retention of sumoylated Tax molecules in the nucleus. These modifications are also instrumental to Tax-1 transcriptional activities. Activation of the I κ B kinase complexes by ubiquitinated Tax-1 molecules determines the translocation of the RelA subunit of NF- κ B to the nucleus. In addition, the sumoylated Tax-1 molecules guide the formation of nuclear bodies, which include RelA and are directly involved in Tax-1-mediated activation of gene expression (Lamsoul et al., 2005). The cellular localization of Tax-2 is still a matter of debate. Tax-2 has been reported to be predominantly localized in the cytoplasm (Meertens et al., 2004a; Turci et al., 2006) and to use a functional but dispensable nuclear export system (Chevalier et al., 2005). Whether Tax-2 is post-translationally modified is unknown. We have used internally tagged Tax-1 and Tax-2B to demonstrate that both proteins are modified by ubiquitination and sumoylation, share similar intracellular localization, and activate gene expression via the NF- κ B pathway to similar levels.

Results

The functional comparison of Tax-1 and Tax-2B is limited by the unavailability of a single antibody that recognizes both proteins. Therefore we sought to develop a tagging system that preserved the transcriptional activities of both proteins. Our earlier experiments

* Corresponding author. Fax: +39 45 8027180.

E-mail address: umberto.bertazzoni@univr.it (U. Bertazzoni).¹ These authors made equal contributions to this study.

ARTICLE IN PRESS

2

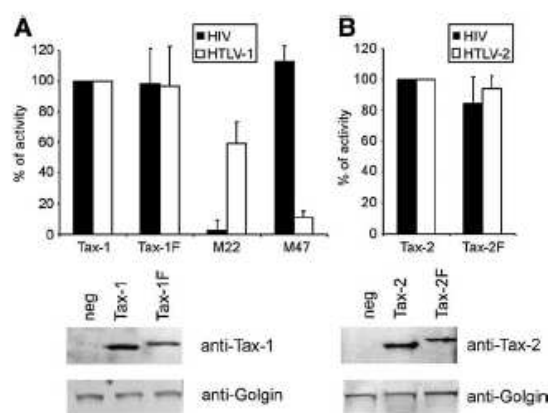
M. Turci et al. / *Virology xxx (2009) xxx–xxx*

Fig. 1. Insertion of an internal Flag-6His tag at amino acid 337 in the Tax-1 and Tax-2B sequences does not affect their transcriptional activities. 293T cells were cotransfected for 24 h with vectors expressing Tax-1 or Tax-1F (A), Tax-2B or Tax-2F (B) in combination with the HTLV-1 LTR-luc or the HTLV-2 LTR-luc for the analysis of activation of gene expression via the ATF/CREB pathway or with the HIV-1 LTR-luc for the analysis of activation of gene expression via the NF- κ B pathway. The lysates were analyzed by western blot with anti-Tax-1 (A), anti-Tax-2 (B) antibodies as well as with anti-Golgin as a control for equal loading of the different samples. The data of the luciferase assays are normalized for the amounts of the different Tax proteins as quantified on the western blots. The results represent the averages and the standard deviations of 3 independent experiments and are presented as percentages of the activity obtained with untagged Tax-1 or Tax-2. Negative (neg) stands for cells transfected with the empty vector.

indicated that addition of terminal tags, such as GFP, to the protein interfered with protein localization and transcriptional efficiency (unpublished observations). Consequently we designed a tagging system by inserting an internal Flag-6His tag in phase at amino acid position 337 of Tax-1 (Tax-1F) and at the equivalent position in the Tax-2B sequence (Tax-2F) (see Materials and methods). This tagging system was designed to enable the detection of both proteins with an anti-Flag antibody and their purification by using the affinity of the 6His tag to Ni-NTA resin. We first compared the western blot patterns of whole cell extracts from 293T cells transfected with the Tax-1F and Tax-2F expression vectors by using available reagents including anti-Tax-1, anti-6His and anti-Flag monoclonal antibodies or an anti-Tax-2 rabbit polyclonal antibody. The results are presented under Supplementary material. A single specific band was revealed for each Tax-1F and Tax-2F with the anti-Flag monoclonal antibody, indicating that this reagent was perfectly suited to make a functional comparison of Tax-1 and Tax-2B.

We then compared the abilities of the tagged Tax-1F and Tax-2F proteins to activate gene expression via the ATF/CREB and the NF- κ B pathways relatively to their untagged Tax-1 and Tax-2 counterparts. In Fig. 1A, 293T cells were cotransfected with the HTLV-1 LTR-luc or HIV-1 LTR-luc reporter constructs and the vectors expressing Tax-1 or Tax-1F, whereas Fig. 1B depicts the activation of the HTLV-2 LTR-luc or the HIV-1 LTR-luc reporter constructs by Tax-2 or Tax-2F. The transactivation data of the tagged proteins are expressed as percentages of the activities of the respective untagged proteins and they are corrected for the amount of each protein estimated on western blot of cell extracts obtained from the same transactivation experiments. No significant differences were observed, indicating that the internal Flag-6His tag inserted in the Tax-1 or Tax-2 proteins did not affect their transcriptional activities. Fig. 1A also includes the transactivation activities of the Tax-1 mutants M22 and M47 as internal negative controls for the activation of the NF- κ B and ATF/CREB pathways, respectively (Sheehy et al., 2006). As expected, no activation of the HIV-1 promoter by the M22 mutant nor of the HTLV-1 promoter by the M47 mutant was observed.

Post-translational modifications, including ubiquitination and sumoylation, are critical properties controlling Tax-1 intracellular localization and transcriptional activities. To determine whether Tax-2B was modified, 293T cells were transfected with vectors expressing either Tax-1 or the internally tagged Tax-1F or Tax-2F, both in the absence and presence of vectors expressing HA-tagged ubiquitin (HA-Ub) or HA-tagged SUMO-1 (HA-SUMO) (Fig. 2). The Tax proteins were purified by Ni-NTA pulldown and first analyzed by western blotting, using anti-Tax-1 and anti-Flag (Fig. 2A) or anti-6His (Fig. 2B). Contrary to what was observed in whole cell extracts from luciferase assays (Figs. 1A and B), purification of Tax proteins by Ni-NTA pulldown under highly denaturing conditions led to the detection not only of the unmodified 40 kDa form of Tax but also of ladders of forms displaying molecular sizes higher than 40 kDa. Co-expression of HA-Ub (Fig. 2C) or HA-SUMO (Fig. 2D) with the different Tax proteins and immunoblot analysis with an anti-HA antibody indicated that these retarded Tax species were ubiquitinated and sumoylated forms of Tax. In addition, the anti-HA blots indicated that Tax-1F displayed ladders of mono-, di-, tri- and poly-ubiquitinated and sumoylated forms very similar to those of the untagged Tax-1 protein. This data indicates that the internal Flag-6His tag does not significantly affect the modification status of the Tax-1F protein. A protein band comigrating with mono-ubiquitinated Tax (Fig. 2C) was detected in cells expressing Tax-1 and it was also detected in cells expressing Tax-1F and Tax-2F, although at a reduced level, namely: 10 fold reduction in intensity, Fig. 2B (anti-6His); 2 fold reduction on Fig. 2A (anti-Tax-1+anti-Flag) and 2 fold reduction on Fig. 2C (anti-HA). This discrepancy could be due to the fact that the 6His epitope fused to the C-terminus of Tax-1 clone is better recognized by the anti-6His antibody than the same epitope fused at an internal position of Tax-1F and Tax-2F clones. Similarly, the

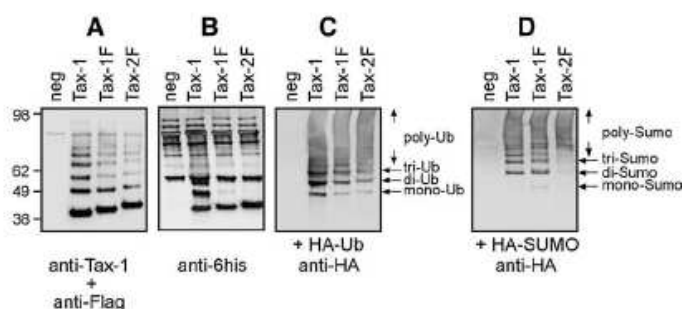


Fig. 2. Tax-2B is modified by ubiquitination and sumoylation. 293T cells were transfected for 24 h with either an empty vector (neg) or with the vectors expressing Tax-1 (Tax-1 6His), Tax-1F or Tax-2F without (A and B) or with vectors expressing either HA-Ub (C) or HA-SUMO (D). The Tax proteins were purified by Ni-NTA pulldown and submitted to immunoblotting with anti-Tax-1 and anti-Flag (A), anti-6His (B) or anti-HA (C, D) antibodies.

Please cite this article as: Turci, M., et al., HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax, *Virology* (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.01.003

ARTICLE IN PRESS

M. Turci et al. / Virology xxx (2009) xxx–xxx

3

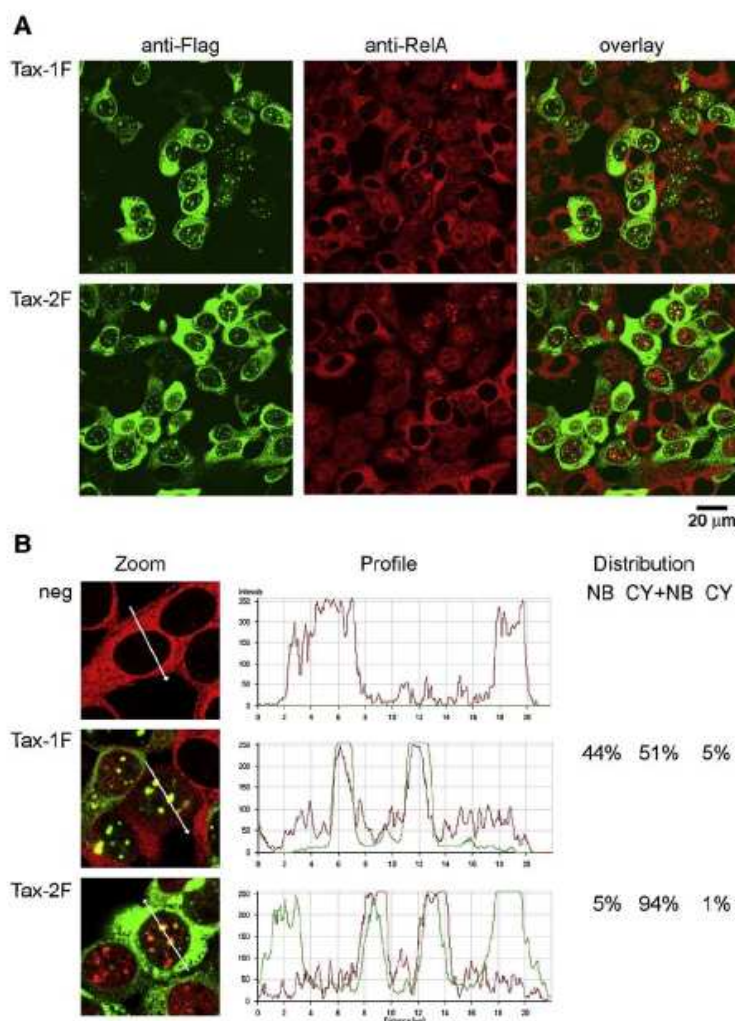


Fig. 3. Tax-2B is distributed both in the cytoplasm and in nuclear bodies. 293T cells were transfected for 24 h with either an empty vector (neg) or vectors expressing either Tax-1F or Tax-2F. The cells were fixed and stained by dual immunofluorescence staining with anti-Flag and anti-RelA antibodies and analyzed by laser scanning confocal microscopy. Single confocal sections of 0.8 μ m of cells expressing either Tax-1F or Tax-2F are presented in (A). The zoom images of representative cells in each transfected cell population is depicted in (B) with the profiles of the intensity of the fluorescence for Tax (green) and RelA (red) staining along lines crossing the nuclei. The percentages of cells displaying a distribution of Tax-1F or Tax-2F only in nuclear bodies (NB), only in the cytoplasm (CY) or both in the cytoplasm and nuclear bodies (CY+NB) was obtained by estimating the distribution of these proteins among at least 300 Tax-expressing cells.

2 fold reduction in the detection of the ubiquitinated Tax-1F forms (Fig. 2C) could be due to a less efficient purification by Ni-NTA pulldown of the internally 6His-tagged Tax-1F. Importantly, the anti-HA immunoblots also revealed that Tax-1F and Tax-2F displayed similar patterns and intensities of ubiquitinated forms (Fig. 2C). In contrast, poly-sumoylated forms of Tax-2F were readily detected, whereas the appearance of mono-, di- and tri-sumoylated forms was drastically reduced as compared to Tax-1F (Fig. 2D). These results indicate that Tax-2B was ubiquitinated and sumoylated, and that the pattern of ubiquitinated forms was identical to that of Tax-1. However, the sumoylation pattern of Tax-2B was predominantly represented by poly-branched forms.

The intracellular distribution of internally Flag-tagged Tax-1 and Tax-2 constructs in 293T cells was analyzed by confocal microscopy.

Given the importance of re-localization of the RelA subunit of NF- κ B within Tax-1 nuclear bodies for its activation of gene expression via the NF- κ B pathway (Bex et al., 1997; Lamsoul et al., 2005), we used dual immunofluorescence staining with anti-Flag and anti-RelA antibodies to determine the relative intracellular localization of Tax-1 or Tax-2B and endogenous RelA. Fig. 3A depicts single confocal sections of 293T cells transfected with the Tax-1F or Tax-2F expression vectors. In Fig. 3B, a zoom image of representative single cells transfected with either an empty vector (neg) or vectors expressing Tax-1F or Tax-2F are displayed together with the diagram depicting the intensity of the fluorescence for both Tax (green) and RelA (red) along a line drawn across the nucleus. As previously demonstrated for untagged Tax-1 (Lamsoul et al., 2005), Fig. 3A indicates that the distribution of Tax-1F is heterogeneous, with cells displaying Tax only

ARTICLE IN PRESS

4

M. Turci et al. / Virology xxx (2009) xxx–xxx

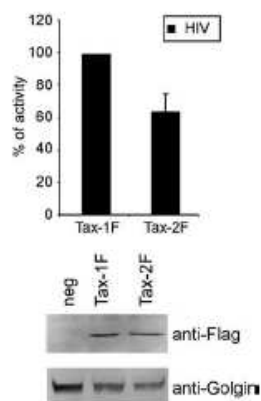


Fig. 4. Tax-1 and Tax-2 activate the NF- κ B pathway to similar levels. 293T cells were cotransfected for 24 h with vectors expressing Tax-1 or Tax-2 in combination with the HIV-1 LTR-luc reporter construct for the analysis of activation of gene expression via the NF- κ B pathway. The lysates were analyzed by western blot with anti-Flag antibody as well as with anti-Golgin as a control for equal loading of the different samples. The data of the luciferase assays, normalized for the amounts of the different Tax proteins as quantified on the western blots, represent the averages and the standard deviations of 3 independent experiments and are presented as percentages of the activity obtained with Tax-1F.

in nuclear bodies (NB) or in the cytoplasm (CY) or both in the cytoplasm and in nuclear bodies (CY+NB). The percentages of cells displaying each distribution were estimated among at least 300 Tax-1F- or Tax-2F-expressing cells and the results are reported in Fig. 3B.

In cells that did not express Tax, RelA was only detected in the cytoplasm. The percentages of cells displaying Tax-1F only in nuclear bodies (44%), both in the cytoplasm and in nuclear bodies (51%) or only in the cytoplasm (5%) are shown in Fig. 3B. Expression of Tax-1F resulted in a reduction of the intensity of the RelA fluorescence in the cytoplasm and its relocalization in Tax-1 nuclear bodies as previously described (Bex et al., 1997). Interestingly, Tax-2F was distributed both in the cytoplasm and in nuclear bodies in 94% of the cells, and induced the migration of RelA to the nucleus as well as its concentration in Tax-2B nuclear bodies as indicated by the profile of the immunofluorescence staining for both Tax-2F and RelA (Fig. 3B). The nuclear bodies assembled by Tax-2F were smaller than those assembled by Tax-1F in most of the cells. We conclude that Tax-2B was ubiquitinated and sumoylated, although with a reduced representation of poorly branched sumoylated forms of Tax-2B. In addition, whereas the distribution of Tax-1 was mainly in the nuclear bodies or both in the cytoplasm and nuclear bodies, that of Tax-2B was both in the cytoplasm and in nuclear bodies in most of the cells. Finally, Tax-2B induced the concentration of the RelA subunit of NF- κ B in nuclear bodies in a way similar to that used by Tax-1.

Since ubiquitination and sumoylation of Tax-1, followed by the relocalization of RelA in nuclear bodies, are critical events for Tax-1-mediated activation of gene expression via the NF- κ B pathway, we compared the abilities of Tax-1F and Tax-2F to activate the expression of the NF- κ B-controlled HIV-1 LTR-luc reporter construct. The data reported in Fig. 4 indicated that the Tax-2F capacity to activate gene expression from the HIV-1 promoter was reduced to 64% \pm 12% of that observed for Tax-1F.

Discussion

In this work, we demonstrate that Tax-2B, which shares an amino acid sequence similarity of 85% with Tax-1, is modified by ubiquitina-

tion and sumoylation. Tax-2B is distributed both in the cytoplasm and in nuclear bodies and is able to induce the translocation of the RelA subunit of NF- κ B and its recruitment in nuclear bodies as has been previously observed for Tax-1 (Lamsoul et al., 2005). These comparisons are strengthened by the fact that the Tax-1 and Tax-2B proteins were tagged with the same internal Flag epitope that preserved the typical transcriptional properties of the two proteins and enabled their recognition by a single antibody.

Tax-2 intracellular localization has been studied by several authors and was reported to be predominantly localized in the cytoplasm (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004a; Semmes et al., 1996; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2006). We have used the recognition of a common Flag epitope inserted at equivalent positions in the Tax-1 and Tax-2B proteins by the highly specific anti-Flag antibody to compare the intracellular localization of these proteins. We confirmed that Tax-2B is more frequently present in the cytoplasm (95%) as compared to Tax-1 (56%). In addition, we demonstrated that, in a way similar to Tax-1, Tax-2B is also localized both in nuclear bodies and in the cytoplasm in the great majority of the cells. A similar distribution of Tax-2B in the cytoplasm and in nuclear bodies was also noted by Sheehy et al., 2006.

The reduced pool of mono-, di- and tri-sumoylated molecules, observed for Tax-2B, is consistent with a reduced size of the nuclear bodies assembled by Tax-2B and with an increased fraction of cells displaying Tax-2B in the cytoplasm with respect to Tax-1. This correlation is consistent with our previous observation that sumoylation is critical for the formation of the nuclear bodies and for the retention of Tax-1 in the nucleus (Lamsoul et al., 2005). However, the reduced pool of poorly branched Tax-2B molecules appeared to have no consequence on the formation of, albeit smaller, nuclear bodies and on the relocalization of RelA in these structures. These data suggest that poly-sumoylated Tax-2B with branching higher than three molecules of SUMO might be a determinant in the assembly of these nuclear structures. The analysis of sumoylation deficient mutant of Tax-2B should enable us to better understand the role of sumoylation in the formation of Tax-2 nuclear bodies and in its transcriptional activities.

A comparative analysis of Tax-1 and Tax-2 transcriptional activities has been reported by several studies and different results have been obtained (Endo et al., 2002; Lewis et al., 2002; Meertens et al., 2004b; Sieburg et al., 2004; Tanaka et al., 1996; Xie et al., 2006; Niinuma et al., 2005). Our careful study using Tax-1 and Tax-2B clones with insertion of internal Flag-6His tags, which do not interfere with their transcriptional activities, led to the conclusion that Tax-1 and Tax-2B share similar, though not identical, abilities to activate gene expression via the NF- κ B pathway (64% \pm 12% for Tax-2B relatively to Tax-1). Since ubiquitination and sumoylation control both Tax intracellular localization and its transcriptional activities, the altered sumoylation pattern of Tax-2B and the changes in the balance between cytoplasmic and nuclear distribution might explain the modest reduction in the capacity of Tax-2B to activate gene expression via the NF- κ B pathway.

Our data do not support the hypothesis that differences in pathogenicity between HTLV-1 and HTLV-2 can be solely attributed to properties linked to the transcriptional activities of their respective Tax proteins. Other determinants that control the differential abilities of Tax-1 and Tax-2B to interact with PDZ domain-containing proteins, to form micronuclei, to block hematopoiesis or to inhibit the transcriptional function of the tumor suppressor p53 should be considered. The differential expression of the recently discovered HBZ protein by HTLV-1 and HTLV-2 might also govern the pathogenic profile of these viruses (Xie et al., 2006). The possibility that activities of Tax-1 and Tax-2 other than their capacity to activate the NF- κ B pathway are involved in the variable transformation activity is largely supported by other authors (Endo et al., 2002). Our results are adding new support in favour of this idea.

ARTICLE IN PRESS

M. Turci et al. / Virology xxx (2009) xxx–xxx

5

Materials and methods

Construction of expression vectors

The Tax-2B expression plasmid, pJFE-Tax-2, was prepared by cloning the fragment obtained by PCR amplification of the *tax-2B* coding sequence (Turci et al., 2006) in the *EcoRI* restriction site of the pJFE14 expression vector (Takebe et al., 1988). The Tax-1F and Tax-2F plasmids were produced by inserting the sequence coding for the Flag epitope followed by 6 histidines, at nucleotide position 1011 of the Tax-1 and Tax-2B coding sequences, leading to in phase insertion of 14 amino acids at amino acid position 337 of the two sequences. The Tax-1F and Tax-2F constructs were cloned into the pcDNA6.2/N expression vector (Invitrogen Corporation; Carlsbad, Ca, USA) using *EcoRI* restriction sites. The vectors expressing ubiquitin or SUMO-1 tagged with the hemagglutinin epitope of influenza (HA) at their amino-terminus and the reporter plasmids HTLV-1 LTR-luciferase and HIV-1 LTR-luciferase were previously described (Lamsoul et al., 2005). The HTLV-2 LTR-luciferase was kindly donated by R. Mahieux.

Cell culture and transient expression by transfection

293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-Glutamine, 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin-streptomycin and 1 mM sodium pyruvate (Gibco) and transfected using the Polyfect reagent (Qiagen Sciences; Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies

The rabbit polyclonal antibodies anti-HA (Y-11) and anti-RelA (C-20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The monoclonal antibody anti-Flag (M2) was from Sigma and the anti-6His (Penta.His) monoclonal antibody was from Qiagen. The anti-Tax-1 monoclonal antibody from hybridoma 168-A51 was obtained from the AIDS research and Reagent Program, National Institutes of Health. The anti-Tax-2 rabbit polyclonal serum was kindly provided by R. Mahieux (Meertens et al., 2004a).

Immunocytochemistry and confocal microscopy

Cells cultured on glass coverslips were transfected with expression plasmids for 24 h and processed for dual immunofluorescence staining with the mouse monoclonal anti-Flag antibody and the rabbit polyclonal anti-RelA antibody followed by the secondary antibodies, goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugated to Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 594 (Invitrogen). The specimens were analyzed with a laser scanning confocal microscope (LSM 510, Zeiss) using a 63× objective and light source wavelengths of 488 and 543 nm.

Ni-NTA pulldown and western immunoblot analysis

293T cells were lysed 24 h after transfection and Ni-NTA pulldown was done as described previously (Lamsoul et al., 2005). The purified proteins were electrophoresed on 4–12% Bis-Tris NuPAGE gel (Invitrogen), transferred to Hybond ECL Nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech), and immunoblotted with primary and corresponding secondary antibodies according to the conditions suggested by the manufactures and by Meertens et al., 2004a. The detection was by Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) or Chemi-luminescent Peroxidase Substrate (Sigma Aldrich). Detection and quantitation of chemiluminescent signals were performed with the Chemi-Smart 5000 and Bio-1D software (Vilber Lourmat, France) or Autochemi and Gel Pro Analyzer (UVP BioImaging Systems, CA, USA).

Luciferase assays

Tax-1- and Tax-2B-mediated transactivation of the HTLV-1, HTLV-2 or HIV-1 promoters was assayed by dual luciferase assays. 293T (1.25×10^5 cells) were transfected into 12 wells with 50 ng of pHRG-TK (Promega), which was used for monitoring the transfection efficiency, 500 ng of HTLV-1-LTR-, HTLV-2-LTR, or HIV-1-LTR-luciferase reporter plasmids and with 400 ng each of the different Tax-1 or Tax-2 constructs. Cells were lysed and subjected to luciferase assay with a luminometer TD-20/20 (Turner Designs) using the Dual-luciferase reporter assay system (Promega).

Acknowledgments

This work was supported by MIUR PRIN 2005 and 2007 and Cariverona (to U. Bertazzoni) and by the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique and Télévie and by the Internationale Brachet Stiftung (to F. Bex). The authors express their thanks to Prof. L. Rasmussen (Stanford University) for a critical reading of the paper, to Dr. R. Mahieux (Institut Pasteur) for the antibody against Tax-2 and to Drs Pamela Lorenzi and Marzia Di Chio (University of Verona) for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.viro.2009.01.003.

References

- Araujo, A., Hall, W.W., 2004. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann. Neurol.* 56 (1), 10–19.
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A., Gaynor, R., 1997. The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J. Virol.* 71 (5), 3484–3497.
- Chevalier, S.A., Meertens, L., Calattini, S., Gessain, A., Kiemer, L., Mahieux, R., 2005. Presence of a functional but dispensable nuclear export signal in the HTLV-2 Tax protein. *Retrovirology* 2, 70.
- Endo, K., Hirata, A., Iwai, K., Sakurai, M., Fukushi, M., Oie, M., Higuchi, M., Hall, W.W., Gejyo, F., Fujii, M., 2002. Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than HTLV-1 Tax. *J. Virol.* 76 (5), 2648–2653.
- Feuer, G., Green, P.L., 2005. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24 (39), 5996–6004.
- Gidin, S.D., Lindholm, P.F., Marriott, S.J., Brady, J.N., 1991. Transdominant human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mutant that fails to localize to the nucleus. *J. Virol.* 65 (5), 2612–2621.
- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R.B., Bex, F., 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 25 (23), 10391–10406.
- Lewis, M.J., Sheehy, N., Salemi, M., VanDamme, A.M., Hall, W.W., 2002. Comparison of CREB- and NF-kappaB-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) tax proteins. *Virology* 295 (1), 182–189.
- Mahieux, R., Pise-Masison, C.A., Lambert, P.F., Nicot, C., De Marchis, L., Gessain, A., Green, P., Hall, W., Brady, J.N., 2000. Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function. *J. Virol.* 74 (15), 6866–6874.
- Matsuoka, M., Jeang, K.T., 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 7 (4), 270–280.
- Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A., Mahieux, R., 2004a. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* 279 (41), 43307–43320.
- Meertens, L., Pise-Masison, C., Quere, N., Brady, J., Gessain, A., Mahieux, R., 2004b. Utilization of the CBP but not the p300 co-activator by human T-lymphotropic virus type-2 Tax for p53 inhibition. *Oncogene* 23 (32), 5447–5458.
- Niinuma, A., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F., Tanaka, N., Sugamura, K., Xie, L., Green, P.L., Fujii, M., 2005. Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus. *J. Virol.* 79 (18), 11925–11934.
- Semmes, O.J., Mijone, F., Cantemir, C., Turchetto, L., Hjelle, B., Jeang, K.T., 1996. HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs. *Virology* 217 (1), 373–379.
- Sheehy, N., Ellis, L., Watters, K., Lewis, M., Gautier, V., Hall, W., 2006. Functional analysis of human T lymphotropic virus type 2 Tax proteins. *Retrovirology* 3, 20.

Please cite this article as: Turci, M., et al., HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax, *Virology* (2009), doi:10.1016/j.viro.2009.01.003

ARTICLE IN PRESS

6

M. Turci et al. / Virology xxx (2009) xxx–xxx

- Sieburg, M., Tripp, A., Ma, J.W., Feuer, G., 2004. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax oncoproteins modulate cell cycle progression and apoptosis. *J. Virol.* 78 (19), 10399–10409.
- Takebe, Y., Seki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., Arai, N., 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8 (1), 466–472.
- Tanaka, Y., Hayashi, M., Takagi, S., Yoshie, O., 1996. Differential transactivation of the intercellular adhesion molecule 1 gene promoter by Tax1 and Tax2 of human T-cell leukemia viruses. *J. Virol.* 70 (12), 8508–8517.
- Tripp, A., Banerjee, P., Sieburg, M., Planellas, V., Li, F., Feuer, G., 2005. Induction of cell cycle arrest by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax in hematopoietic progenitor (CD34+) cells: modulation of p21cip1/waf1 and p27kip1 expression. *J. Virol.* 79 (22), 14069–14078.
- Tsuji, T., Sheehy, N., Gaudier, V.W., Hayakawa, H., Sawa, H., Hall, W.W., 2007. The nuclear import of the human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Tax protein is carrier and energy independent. *J. Biol. Chem.* 282 (18), 13875–13883.
- Turci, M., Romanelli, M.G., Lorenzi, P., Righi, P., Bertazzoni, U., 2006. Localization of human T-cell lymphotropic virus type II Tax protein is dependent upon a nuclear localization determinant in the N-terminal region. *Gene* 365, 119–124.
- Xie, L., Yamamoto, B., Haoudi, A., Semmes, O.J., Green, P.L., 2006. PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood* 107 (5), 1980–1988.